

Sarah Fröbel
Institut für Rebenzüchtung

Studien zum Resistenzlokus *Rpv10*
gegen den Falschen Mehltau
(*Plasmopara viticola*)
der Weinrebe (*Vitis vinifera*)



Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut

Kontakt/Contact:
Sarah Fröbel
Rietenauer Weg 9
71522 Backnang

Die Schriftenreihe „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ veröffentlicht Doktorarbeiten, die in enger Zusammenarbeit mit Universitäten an Instituten des Julius Kühn-Instituts entstanden sind.

The publication series „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ publishes doctoral dissertations originating from research doctorates and completed at the Julius Kühn-Institut (JKI) either in close collaboration with universities or as an outstanding independent work in the JKI research fields.

Der Vertrieb dieser Monographien erfolgt über den Buchhandel (Nachweis im Verzeichnis lieferbarer Bücher - VLB) und OPEN ACCESS im Internetangebot www.julius-kuehn.de Bereich Veröffentlichungen.

The monographs are distributed through the book trade (listed in German Books in Print - VLB) and OPEN ACCESS through the JKI website www.julius-kuehn.de (see Publications).

Wir unterstützen den offenen Zugang zu wissenschaftlichem Wissen.
Die Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut erscheinen daher OPEN ACCESS.
Alle Ausgaben stehen kostenfrei im Internet zur Verfügung:
<http://www.julius-kuehn.de> Bereich Veröffentlichungen.

We advocate open access to scientific knowledge. Dissertations from the Julius Kühn-Institut are therefore published open access. All issues are available free of charge under <http://www.julius-kuehn.de> (see Publications).

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation
In der Deutschen Nationalbibliografie: detaillierte bibliografische
Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek (German National Library)

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.dnb.de>.

ISBN 978-3-95547-084-5
DOI 10.5073/dissjki.2019.006

Herausgeber / Editor

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg, Deutschland
Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Quedlinburg, Germany

© Der Autor/ Die Autorin 2019.



Dieses Werk wird unter den Bedingungen der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0) zur Verfügung gestellt (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>).

© The Author(s) 2019.



This work is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en>).

Studien zum Resistenzlokus *Rpv10* gegen den Falschen Mehltau (*Plasmopara viticola*) der Weinrebe (*Vitis vinifera*)

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften am Karlsruher Institut für
Technologie

vorgelegt von

Sarah Fröbel, MSc

Erster Referent: Prof. Dr. Eva Zyprian

Zweiter Referent: Prof. Dr. Peter Nick

Verteidigt am: 18. Oktober 2019

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde am Julius Kühn-Institut (JKI) - Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof in Siebeldingen in der Abteilung molekulare Pflanzengenetik unter Leitung von Frau Prof. Zyprian von Oktober 2016 bis September 2019 angefertigt.

Das vorliegende Forschungsprojekt wurde durch den Forschungsring des Deutschen Weinbaus (FDW) bei der deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft e.V. (DLG) finanziell gefördert.

Abstract

Previous studies promoted molecular and histological investigations on the resistance locus *Rpv10* originating from the Asian wild species *Vitis amurensis*. By sequencing the two haplotypes of the *Rpv10* locus of the cultivar 'Solaris' some candidate genes were characterized by bioinformatic tools, isolated by amplification with specific primers and transformed into susceptible grapevines grown *in vitro* (Dudenhöffer and Zyprian, unpubliziert).

Microscopic studies on a *Rpv10* carrying cultivar and different reference varieties (a susceptible genotype, *Rpv3.3* carriers and genotypes with *Rpv10/Rpv3.3*) provided important information on the resistance mechanism at different time points after inoculation. At seven days post-inoculation strong differences between the different genotypes became obvious. These can already be recognized macroscopically at this time. Microscopic differences appear already after four days at the growth of the mycelium within the mesophyll. For objective evaluation of the microscopic images after seven days, the software WinRhizo was used to calculate the area of mycelium growth within the mesophyll.

RNA-Seq studies on a homozygous (*Rpv10/Rpv10*), a heterozygous (*Rpv10/Rpv3.3*) and susceptible reference genotypes provided useful insights. The number of induced genes in the different genotypes was evaluated and classified according to GO terms that are important for pathogen-plant interaction. As expected, the highest number of induced genes could be detected in the heterozygous genotype. The susceptible genotype is the taillight in all analyses performed. Furthermore, two important gene clusters for the different genotypes could be described on chromosome 16. The first gene cluster is a *PAL* cluster (15 genes) which is known to code for the entry of metabolic pathways leading to secondary metabolites when plant cells are damaged. The second gene cluster is an *STS* cluster (35 genes). The genes in this cluster encode for enzymes producing secondary metabolites, more precisely phytoalexins. These are activated by *PAL*. They are described in many literature sources as defensive substances against bacteria, fungi, viruses and insects. In this *STS* cluster it could be shown that 27 *STS* genes are strongly upregulated in the heterozygous genotype. In the susceptible genotype, however, only seven genes were upregulated.

For the validation of the RNA-Seq analysis, qRT-PCR was performed on selected genes encoding transcription factors. In addition the amount of stilbenes was analysed at certain times (0 hpi, 24 hpi, 48 hpi and 72 hpi). Three different genotypes ('Solaris', 'Sibera' and 'Müller-Thurgau') were used for qRT-PCR. The stilbene analyses were performed with identical genotypes as selected for microscopy. Both validation methods confirm the results of the RNA-Seq analysis.

Kurzfassung

Durch vorangegangenen Studien entstanden weiterführende Fragestellungen an dem ursprünglich die aus der asiatischen Wildspezies *Vitis amurensis* stammenden Resistenzlokus (*Rpv10*-Lokus) bearbeitet wurden. Die Sequenzierung der beiden Haplotypen des *Rpv10*-Lokus der Sorte 'Solaris' ergab eine Auswahl von Kandidatengenen. Diese wurden zunächst bioinformatisch charakterisiert, im Anschluss durch spezifische Primer erfolgreich amplifiziert und in anfällige Reben *in vitro* transformiert.

Durch mikroskopische Studien an *Rpv10*-Trägern und verschiedenen Vergleichssorten (ein anfälliger Genotyp, ein *Rpv3.3*-Träger und Genotypen mit *Rpv10/Rpv3.3*) wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach experimenteller Inokulation wichtige Informationen zum Resistenzmechanismus erarbeitet. Hier zeigen sich nach sieben Tag post Inokulation deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen. Diese sind zu diesem Zeitpunkt bereits makroskopisch zu erkennen. Mikroskopische Unterschiede zeigen sich bereits nach vier Tagen am Wachstum des Mycel innerhalb des Mesophylls. Für die objektive Bewertung der mikroskopischen Aufnahmen nach sieben Tagen wurde die Software WinRhizo genutzt, um die Fläche des Myzels im Mesophyll zu berechnen.

Durch RNA-Seq-Studien an einem homozygoten (*Rpv10/Rpv10*), einem heterozygoten (*Rpv10/Rpv3.3*) und anfälligen Referenzgenotypen konnten neue Erkenntnisse gewonnen werden. Hier wurde die Anzahl der induzierten Gene in den verschiedenen Genotypen ausgewertet und nach, für die Pathogen-Pflanze-Interaktion wichtigen, GO-Termen eingeteilt. Erwartungsgemäß wurde die höchste Anzahl an induzierten Genen in dem heterozygoten Genotypen nachgewiesen. Der anfällige Genotyp bildet in allen durchgeführten Analysen das Schlusslicht. Weiterhin konnten auf Chromosom 16 zwei wichtige Gen-Cluster für die Wirt-Pathogen-Interaktion beschrieben werden. Bei dem ersten Gen-Cluster handelt es sich um ein *PAL*-Cluster (15 Gene) dessen Genprodukte dafür bekannt sind, bei Beschädigung der Pflanzenzellen Sekundärmetabolite zu induzieren. Das zweite ist ein *STS*-Cluster (35 Gene). Die darin befindlichen Gene führen zur Synthese von Sekundärmetaboliten, genauer zu den Phytoalexinen. Sie werden in vielen Literaturquellen als Abwehrstoffe gegen Bakterien, Pilze, Viren und Insekten beschrieben. In diesem *STS*-Cluster konnte gezeigt werden, dass bei Inokulation im heterozygoten Genotypen 27 *STS*-Gene stark hochreguliert werden. Im anfälligen Genotypen wurden dagegen nur sieben Gene hochreguliert.

Für die Validierung der RNA-Seq-Analyse wurde eine qRT-PCR an ausgewählten Genen für Transkriptionsfaktoren so wie eine Stilben-Analyse zu bestimmten Zeitpunkten (0 hpi, 24 hpi, 48 hpi und 72 hpi) durchgeführt. Für die qRT-PCR wurden drei verschiedene Genotypen ('Solaris', 'Sibera' und 'Müller-Thurgau') verwendet. Die Stilben-Analysen wurden mit den identischen Genotypen wie die durch Mikroskopie untersucht ausgewählt. Beide Validierungsmethoden bestätigen die Ergebnisse der RNA-Seq-Analyse.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	xii
Tabellenverzeichnis	xv
Abkürzungen	xvii
1 Einleitung	1
1.1 Die Weinrebe	1
1.1.1 Bedeutende Pathogene der Weinrebe	1
1.1.2 <i>Plasmopara viticola</i> , der Erreger des Falschen Mehltaus der Weinrebe	1
1.1.3 Bekämpfungsstrategien gegen <i>P. viticola</i>	5
1.2 Pathogen-Pflanze-Interaktion	5
1.2.1 Pflanzliche Resistenz	5
1.2.2 Pathogenerkennung	6
1.2.3 Pflanzliche Sekundärmetabolite - Stressmetabolite	7
1.3 Resistenzzüchtung bei Reben	10
1.4 Der <i>Rpv10</i> -Lokus	11
1.5 Ziel der Arbeit	12
2 Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Software und Datenbanken	16
2.1.2 Geräte	17
2.1.3 Kits	18
2.1.4 Enzyme, Antibiotika und andere Substanzen	19
2.1.5 Vektor	20
2.1.6 Bakterienstämme und BAC-Klone	20
2.1.7 Pflanzenmaterial	21
2.1.8 Nährmedien	22
2.1.9 Färbelösungen	22
2.1.10 Puffer	23
2.1.11 Isolation von Plasmid-DNA nach Birnboim and Doly (1979)	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 Bioinformatische Analyse der Kandidatengensequenzen	24
2.2.2 Blattscheiben Tests	27
2.2.3 Trypanblau-Lebend-Färbung	27
2.2.4 Anilin-Blau-Färbung	28
2.2.5 Calcofluor White Färbung	28
2.2.6 4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) Färbung	28
2.2.7 Mikroskopie	28

2.2.8	Analyse von Winterknospen	29
2.2.9	Extraktion von Nukleinsäuren	30
2.2.10	Decapping von mRNAs	32
2.2.11	RNA-Ligation	32
2.2.12	cDNA-Synthese	33
2.2.13	Amplifikation der Kandidatengene	34
2.2.14	Klonierung der Kandidatengene - In-Fusion [®] HD Cloning	36
2.2.15	3'-RACE-PCR	36
2.2.16	5'-RACE-PCR	37
2.2.17	Circularized Reverse Transcription PCR (CR-RT-PCR)	38
2.2.18	RNA-Seq-Analyse	38
2.2.19	Der <i>Rpv10</i> -Lokus und seine Gene in der RNA-Seq-Analyse	39
2.2.20	qRT-PCR	39
2.2.21	Stilben-Analyse	40
2.2.22	Berechnung der Myzelfläche im Vergleich zwei und sieben Tage nach Inokulation	43
2.2.23	Triparentales Mating	44
2.2.24	Transformation in Kalli verschiedener anfälliger <i>Vitis</i> -Genotypen	45
2.2.25	Selektion regenerierter Keimlinge	46
3	Ergebnisse	49
3.1	Bioinformatische Analyse der Kandidatengensequenzen	49
3.1.1	Kernimportsignale (NLS)	50
3.1.2	Nucleotide Binding Site (NBS) Motive	51
3.1.3	Leucine Rich Repeat (LRR) Motive	51
3.1.4	Motive von Peptidsegmenten in Nucleotide Binding Sites (NBS)	53
3.1.5	Vergleich des anfälligen und resistenten Haplotypen des Kandidatengens <i>Rpv10#1</i> - Unterschiede in der DNA-Sequenz zur Aminosäuresequenz	54
3.1.6	Promotor-Analysen	58
3.2	Kandidatengene	58
3.2.1	Klonierung der Kandidatengene	58
3.2.2	3'-RACE-Analyse	60
3.2.3	5'-RACE-Analyse	60
3.2.4	CR-RT-PCR	61
3.3	RNA-Seq-Analyse	62
3.3.1	Anzahl der differentiell exprimierten Gene (DEGs)	62
3.3.2	Cluster-Analyse und Einteilung nach Gene Ontology (GO)	64
3.3.3	Gene auf Chromosom 16	65
3.3.4	Die Gene des <i>Rpv10</i> -Lokus in der RNA-Seq-Analyse	70
3.4	Validierung der RNA-Seq-Analyse mittels qRT-PCR	73
3.5	Mikroskopie	76
3.5.1	Anilin-Blau-Färbung	76
3.5.2	Nachweis von Superoxiden - NBT-Färbung	82
3.5.3	Nachweis von Stilbenen in der Mikroskopie	82
3.5.4	Berechnung der Myzelfläche im Vergleich zwei und sieben Tage nach Inokulation	82
3.5.5	Analyse von Winterknospen	85
3.5.6	Histologische Studien mit <i>P. viticola</i>	86

3.6	Stilben-Analyse	92
3.6.1	Stilben-Analysen an verschiedenen <i>Rpv</i> -Trägern	92
3.7	Transformation in anfällige <i>in vitro</i> Reben	97
4	Diskussion	101
4.1	Elektronentransport und Metabolite - Erste Instanz der Pathogenabwehr	101
4.1.1	RNA-Seq-Analyse	102
4.1.2	Regulation ausgewählter Transkriptionsfaktoren - qRT-PCR	102
4.1.3	Nachweis der Induktion von <i>STS</i> -Genen	103
4.1.4	Stilben-Analyse mittels HPLC	103
4.1.5	Mikroskopie	104
4.2	Die Kandidatengene des <i>Rpv10</i> -Lokus - Zweite Instanz der Pathogenabwehr	105
4.2.1	Das Kandidatengen <i>Rpv10#1</i>	105
4.2.2	Das Kandidatengen <i>Rpv10#2</i>	107
4.2.3	Die Kandidatengene in der RNA-Seq-Analyse	108
4.3	Pathogenkolonisierung und Überwinterung	109
5	Schlussfolgerungen und Ausblick	111
6	Danksagungen	113
	Literaturverzeichnis	115
A	Anhang	133
A.1	Tabellen	134
A.2	Abbildungen	140
B	Selbstständigkeitserklärung	143
C	Über die Autorin	145
C.1	Lebenslauf	145
C.2	Publikationen	145

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schadbild von <i>P. viticola</i>	2
1.2	Lebenszyklus von <i>P. viticola</i>	4
1.3	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer <i>P. viticola</i> Infektion.	5
1.4	Phenylpropanoid-Pathway	9
1.5	Stammbaum der Kreuzungspopulation GF.GA-52-42 x 'Solaris'	11
1.6	QTL des <i>Rpv10</i> -Lokus	12
2.1	Die sechs NLS-Klassen als „regulärer Ausdruck“ für die Motivsuche definiert. . .	25
2.2	Die fünf NBS-Klassen wurden als „regulärer Ausdruck“ für die Motivsuche definiert.	25
2.3	Die fünf LRR-Klassen wurden als „regulärer Ausdruck“ für die Motivsuche definiert.	26
2.4	Die neun Motive von Peptidsegmenten-Klassen wurden als „regulärer Ausdruck“ für die Motivsuche definiert.	26
2.5	Knospe von 'Solaris' am 5. März 2018.	30
2.6	Prinzip 3'-RACE	37
2.7	Prinzip 5'-RACE	38
2.8	Probenvorbereitung zur Stilben-Analyse.	42
2.9	„Color Analysis“ mit WinRhizo.	44
2.10	Schema des triparentalen Matings.	45
2.11	Anzucht embryonalen Gewebes am Beispiel von 'Chardonnay'.	46
2.12	Anzucht transgener Reben am Beispiel von 'Chardonnay'.	47
3.1	Überblick über die Kandidatengene mit ihren endogenen Promotoren auf DNA- Ebene.	50
3.2	Ergebnisse des „Large Gap Read mapping“ (<i>Rpv10#1</i> und <i>Rpv10#2</i> auf DNA- Ebene) im anfälligen <i>Rpv10</i> -Lokus.	51
3.3	Ergebnisse des „Large Gap Read mapping“ (<i>Rpv10#1</i> und <i>Rpv10#2</i> auf DNA- Ebene) im resistenten <i>Rpv10</i> -Lokus.	53
3.4	Vergleich der DNA-Sequenz mit der kodierten Aminosäuresequenz innerhalb der LRR-Domäne des Kandidatengens <i>Rpv10#1</i>	56
3.5	Amplifikate der Kandidatengene <i>Rpv10#1</i> und <i>Rpv10#2</i> mit ihrem endogenen Promotor.	59
3.6	Restriktion der rekombinanten Plasmide mit <i>Bgl</i> II von <i>Rpv10#1</i> und <i>Rpv10#2</i> und ihrem endogenen Promotor nach Klonierung in den Vektor pLH9070.	59
3.7	Amplifikate der 3'-RACE-PCR.	60
3.8	Amplifikate der 5'-RACE-PCR.	61
3.9	Amplifikate der CR-RT-PCR.	61
3.10	Darstellung des Kandidatengens <i>Rpv10#1</i> ^s	62
3.11	Darstellung der Schnittmengen zwischen allen DEGs der drei Genotypen aus der RNA-Seq.	63
3.12	Vorhersage des Gentranskriptes im Kandidatengen <i>Rpv10#2</i>	72

3.13	Vorhersage des Gentranskriptes im Kandidatengen <i>Rpv10#1</i>	73
3.14	Vergleich der mikroskopisch verfolgten Infektionsversuche der <i>Rpv10</i> -Träger mit dem anfälligen Kontrollgenotypen.	78
3.15	Vergleich der mikroskopisch verfolgten Infektionsversuche der <i>Rpv10/Rpv3.3</i> -Träger mit dem anfälligen Kontrollgenotypen.	79
3.16	Vergleich der mikroskopisch verfolgten Infektionsversuche der <i>Rpv3.3</i> -Träger mit dem anfälligen Kontrollgenotypen.	80
3.17	Vergleichsreferenz immun bis extrem resistent.	81
3.18	Vergleichsreferenz resistent bis leicht resistent.	81
3.19	Nachweis der Superoxide zu verschiedenen Zeitpunkten nach Testinokulation.	83
3.20	Mikroskopischer Nachweis von Stilbenen nach 24 hpi.	84
3.21	Vergleich des Zuwachses an Myzel von zwei zu sieben Tagen nach experimenteller Inokulation mit <i>P. viticola</i>	85
3.22	Oogonien an der Innenseite der Knospenschuppen.	85
3.23	Oogonien auf der Blattoberseite nach 7 dpi.	86
3.24	Überblick über <i>P. viticola</i> infizierte Blätter, Blattstiele und Triebspitzen.	87
3.25	Bildung von Haustorien an „fächerartigen“ Hyphen.	88
3.26	Übersicht von jungen infizierten Beeren und deren Samen an 'Pinot blanc'.	89
3.27	Übersicht von spät infizierten Beeren und deren Samen an 'Pinot blanc'.	90
3.28	Untersuchung der Kolonisierung von Blattstielen in 'Pinot noir'.	91
3.29	Darstellung der für <i>P. viticola</i> toxischen Substanzen im zeitlichen Verlauf innerhalb der verschiedenen Genotyen.	96
3.30	Regeneration der transformierten Reben mit den unterschiedlichen Kandidatengen.	98
3.31	Amplifikate des Kandidatengens <i>Rpv10#2</i> aus einer Transformanten.	99
A.1	Darstellung der Gene des anfälligen und resistenten <i>Rpv10</i> -Lokus.	140
A.2	Promotorregion Kanidatengen <i>Rpv10#2^s</i> des <i>Rpv10</i> -Lokus.	141
A.3	Promotorregion Kanidatengen <i>Rpv10#1^s</i> des <i>Rpv10</i> -Lokus.	141
A.4	Darstellung der Expressionsänderung der DEGs als Heatmap vom Genotyp 2011-003-013 (<i>Rpv10/Rpv10</i>).	142
A.5	Darstellung der Expressionsänderung der DEGs als Heatmap vom Genotyp 2008-059-121 (<i>Rpv10/Rpv3</i>).	142
A.6	Darstellung der Expressionsänderung der DEGs als Heatmap vom Genotyp 2008-059-020 (<i>Rpv-/Rpv-</i>).	142

Tabellenverzeichnis

2.1	Software und Tools.	16
2.2	Analysegeräte.	17
2.3	Analysekits.	18
2.4	Enzyme und Substanzen.	19
2.5	Antibiotika für Medien.	20
2.6	Vektoren für Klonierungsarbeiten.	20
2.7	<i>E. coli</i> Stämme für Klonierungsarbeiten.	20
2.8	<i>A. tumefaciens</i> Stämme für Pflanzentransformation.	20
2.9	Auflistung aller verwendeten BAC-Klone.	21
2.10	Rebsorten für Mikroskopie- und Stilbenanalyse.	21
2.11	Zusammensetzung LB-Medium.	22
2.12	Anilin-Blau-Färbung.	22
2.13	Trypanblau-Lebend-Farblösung (0,5%).	22
2.14	Calcofluor White-Färbung.	22
2.15	50x TAE.	23
2.16	1x TE.	23
2.17	Plasmid-Isolations-Lösung I.	23
2.18	Plasmid-Isolations-Lösung II.	23
2.19	Plasmid-Isolations-Lösung IV - Fällungsreagenz.	23
2.20	Puffer für RNase-Lösung.	23
2.21	Symbolik eines regulären Ausdrucks.	24
2.22	Reaktionsansatz für das Decapping der mRNA.	32
2.23	Reaktionsansatz für die Ligation der RNA durch T4-RNA-Ligase.	33
2.24	Cycler-Programm für die cDNA-Synthese.	33
2.25	20 μ l Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese.	33
2.26	50 μ l Reaktionsansatz der cDNA-Synthese bei der CR-RT-PCR und der 5'-RACE.	34
2.27	20 μ l Reaktionsansatz zur Amplifikation der Kandidatengene.	34
2.28	Cycler-Programm zur Amplifikation der Kandidatengene.	35
2.29	10 μ l Reaktionsansatz für das In-Fusion [®] HD Cloning.	36
2.30	Cycler-Programm für die 3'-RACE.	36
2.31	Cycler-Programm für die 5'-RACE.	37
2.32	Master Mix der qRT-PCR.	40
2.33	PCR-Programm zur qRT-PCR.	40
2.34	Elutionsmittelgradient für die HPLC zur Identifikation der Stilbene.	43
3.1	LRR-Motive des kodierten Proteins aus dem Kandidatengen <i>Rpv10#1</i>	52
3.2	Kinase Motive des kodierten Proteins aus dem Kandidatengen <i>Rpv10#1</i>	54
3.3	NMP-Motive des kodierten Proteins aus dem Kandidatengen <i>Rpv10#1</i>	54
3.4	Mutationen innerhalb der LRR-Domäne (57 AS) zwischen den beiden Haplotypen im Kandidatengen <i>Rpv10#1</i>	56

3.5	Mutationen innerhalb der NB-ARC-Domäne (276 AS) zwischen den beiden Haplotypen im Kandidatengen <i>Rpv10#1</i>	57
3.6	Länge der klonierten Amplifikate in dem Vektor pLH9070 (10074 bp).	58
3.7	Absolute und relative Darstellung von exprimierten DEGs aller drei Genotypen aus der RNA-Seq-Berechnung.	63
3.8	Expression der DEGs aller drei Genotypen nach Einteilung verschiedener Cluster.	64
3.9	Anteil (in Prozent) an regulierten Genen in der Untergruppe „Biologische Prozesse“ in den verschiedenen Clustern der drei Genotypen im Test.	65
3.10	Ergebnisse ausgewählter Gene aus der RNA-Seq-Analyse.	66
3.11	Differentielle Expression der Gene im <i>PAL</i> -Cluster auf Chromosom 16.	67
3.12	Teil 1: Differentielle Expression der Gene im <i>STS</i> -Cluster auf Chromosom 16.	68
3.13	Teil 2: Differentielle Expression der Gene im <i>STS</i> -Cluster auf Chromosom 16.	69
3.14	Expression der Gene des <i>Rpv10</i> -Lokus.	71
3.15	Ergebnisse der qRT-PCR.	75
3.16	Mittelwerte der errechneten Myzelfläche zwei und sieben Tage nach Inokulation.	82
3.17	Teil 1: Konzentration der detektierten Substanzen der Stilbene.	93
3.18	Teil 2: Konzentration der detektierten Substanzen der Stilbene.	94
A.4	Teil 1: Organisation der GO-Sub-Terme in der GO-Term-Gruppe „Biologische Prozesse“.	134
A.5	Teil 2: Organisation der GO-Sub-Terme in der GO-Term-Gruppe „Biologische Prozesse“.	135
A.1	Teil 1: Eingesetzte Oligonukleotide für die Versuchsdurchführung.	136
A.2	Teil 2: Eingesetzte Oligonukleotide für die Versuchsdurchführung.	137
A.3	Teil 3: Eingesetzte Oligonukleotide für die Versuchsdurchführung.	138

Abkürzungen

ABR	abscisic acid repressor
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AP2	APETALA 2
AP2/ERF	APETALA 2/ethylene response factor
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
Avr	avirulence
BAC	bacterial artificial chromosome
<i>bar</i>	Phosphinothricin-N-Acetyltransferase-Gen
blast	basic local alignment search tool
ATP	Adenosintriphosphat
<i>Bgl</i>II	Restriktionsendonuklease II isoliert aus <i>Bacillus globigii</i>
bp	base pairs
BSA	Bovines Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CD	conserved domain
CDS	coding sequence
Cm	Chloramphenicol
CR-RT-PCR	Circularized RNA Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
Ct	cycle threshold
DAD	diode-array detector
DAMP	damage-associated molecular pattern
DEG	differentiell exprimierte Gene
DMSO	Dimethyl sulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid

DNase	Desoxyribonuklease
dpi	days post inoculation
GO	gene ontology
GOI	gene of interest
GMP	Guanosinmonophosphat
dpi	days post infection
<i>EcoRI</i>	Restriktionsendonuklease I isoliert aus <i>Escherichia coli</i> Stamm R
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERF	ethylene response factor
ETI	effector triggered immunity
ETS	effector triggered susceptibility
FC	Fold change
FDR	false discovery rate
gDNA	genomic deoxyribonucleic acid
<i>HindIII</i>	Restriktionsendonuklease III isoliert aus <i>Haemophilus influenzae</i> Stamm D
RG	Referenzgen
hpi	hours post infection
HPLC	high performance liquid chromatography
HR	hypersensitive Reaktion
Hz	Hertz
ID	Identifikation
Indel	Insertion/Deletion
ITS	internal transcribed spacer
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
LB	lysogeny broth medium / Luria-Bertani-Medium
LG	linkage group
LRR	leucine rich repeats
MAMP	microbe-associated molecular pattern
MAS	marker assisted selection
MCS	multiple cloning site

mRNA	messenger ribonucleic acid
MYB	Myeloblastosis
NBS	nucleotide binding sites
NB-ARC	nucleotide-binding adaptor shared by APAF-1, R proteins, and CED-4
NBS-LRR	nucleotide binding site - leucine rich repeats
NBT	4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
NGS	next generation sequencing
NLR	nucleotide-binding domain and leusine-rich repeat containing protein family
NLS	nuclear localization signal
NMP	Nucleosidmonophosphate
<i>nptII</i>	Neomycin-Phosphotransferase II-Gen
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
ORI	origin of replication
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Protein
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PCR	polymerase chain reaction
PVP	Polyvinylpolypyrrolidone
PR	pathogenesis related
PRR	pattern recognition receptors
PTI	PAMP triggered immunity
qRT-PCR	(real-time) quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
QTL	Quantitative Trait Locus
RACE	rapid amplification of cDNA ends
rDNA	ribosomal deoxyribonucleic acid
REM	Rasterelektronenmikroskop
rF	relative Luftfeuchtigkeit
<i>R-Gen</i>	Resistenzgen
Rif	Rifampicin

RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
RNA-Seq	ribonucleic acid sequencing - „Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung“
ROS	reactive oxygen species
RPKM	reads per kilobase per million mapped reads
rpm	rotations per minute
RppH	RNA 5' Pyrophosphohydrolase
RPS5	Resistance to <i>Pseudomonas syringae</i> protein 5
Rpv	resistance against <i>Plasmopara viticola</i>
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
RT	reverse Transkriptase
RT-PCR	reverse transkriptase polymerase chain reaction
SAND	SAND-family-gene
SD	standard deviation
SDS	sodium dodecyl sulfate
SE	standard error
SIM	selected iron monitoring
Spec	Spectinomycin
SNP	single nucleotide polymorphism
SSR	simple sequence repeats
STS	Stilbensynthase
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
T-DNA	transfer deoxyribonucleic acid
TE	TRIS-EDTA
TF	Transkriptionsfaktoren
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
UBC	Ubiquitin C gene
UV	Ultraviolett
WRKY	WRKY transcription factor

1 Einleitung

1.1 Die Weinrebe

Die in Europa im Weinbau genutzte Art ist die europäische Kulturrebe *Vitis vinifera* ssp. *vinifera* (This et al., 2006). Sie hat während des Verlaufs ihrer Domestikation größere Beeren hervor gebracht, die zudem einen höheren Zuckergehalt besitzen. Darüber hinaus fand ein Geschlechts-wandel von zweihäusig (Wildrearten) zu hermaphrodit statt (Myles et al., 2011; Zhou et al., 2017). Die ersten Anfänge des Weinbaus in Europa, hier vor allem in Frankreich und Deutsch-land, fanden ca. 700 bis 600 v.Chr. statt. Mittlerweile wird die Weinproduktion auf weltweit 269 Mio. hl geschätzt, die auf einer weltweiten Anbaufläche von 7,54 Mio ha angebaut werden (<http://www.oiv.int/> stand 2019).

1.1.1 Bedeutende Pathogene der Weinrebe

Mit den neuen Handelsaktivitäten zwischen Europa und Amerika seit Mitte des 19. Jahrhunderts wurden versehentlich auch Schaderreger nach Europa importiert (Campbell, 2004; Gessler et al., 2011; Mohr and Herrmann, 2005; Muller and Sleumer, 1934; Agrios, 2005). Zu diesen gehören unter anderem der Erreger des Echten Mehltaus (*Erysiphe necator*), die Reblaus (*Daktulosphaira vitifoliae*) und der Erreger des Falschen Mehltaus (*Plasmopara viticola*). Diese Pathogene hatten katastrophale Folgen für den Weinbau. Dabei kam es jährlich zu extrem hohen Ernteaussfällen, die bei unzureichender Behandlung mit Pflanzenschutzmitteln weiterhin auftreten (Wilcox et al., 2015; Berkeley, 1847).

1.1.2 *Plasmopara viticola*, der Erreger des Falschen Mehltaus der Weinrebe

Plasmopara viticola ((Berk. & Curt.) Berl. & de Toni) wurde das erste Mal 1878 in Europa beschrieben. Bei *P. viticola* handelt es sich um einen obligat biotrophen Oomyceten, der über die Stomata des grünen Gewebes die Rebe befällt (Kassemeyer et al., 2015; Fawke et al., 2015). Die Ausbreitung in Europa löste eine Epidemie aus. Bereits wenige Jahre nach dem Erstbe-fall in Südfrankreich waren nahezu alle Weinanbaugebiete Europas sowie des Mittelmeerraumes betroffen. Grund für diese schnelle Ausbreitung in Europa ist der genetische Hintergrund der angebauten Kulturreben. Die hier heimische *Vitis* Species *V. vinifera* besitzt eine hohe Anfällig-keit gegenüber einer Vielzahl von Schaderregern. Bis heute sind jährlich hohe Ertragseinbußen, unter anderem durch *P. viticola* zu verzeichnen.

Das Schadbild (Abb.: 1.1) des Erregers ist gekennzeichnet durch typische „Ölflecken“ auf der Oberseite der Blätter, die durch den Abbau des Chlorophylls und die veränderte Lichtbrechung

durch Myzel im Mesophyll hervorgerufen werden (Schönbeck et al., 1979). An der Unterseite der befallenen Blätter bildet sich ein weißlicher Rasen aus Sporangioophoren, die aus den Stomata wachsen und so durch neu gebildete Sporangien neue Infektionen hervor rufen. Die größten wirtschaftlichen Probleme entstehen jedoch durch den Befall von Gescheinen oder jungen Beeren. Dieser Befall verhindert das Wachstum oder die Ausreifung der Beeren.

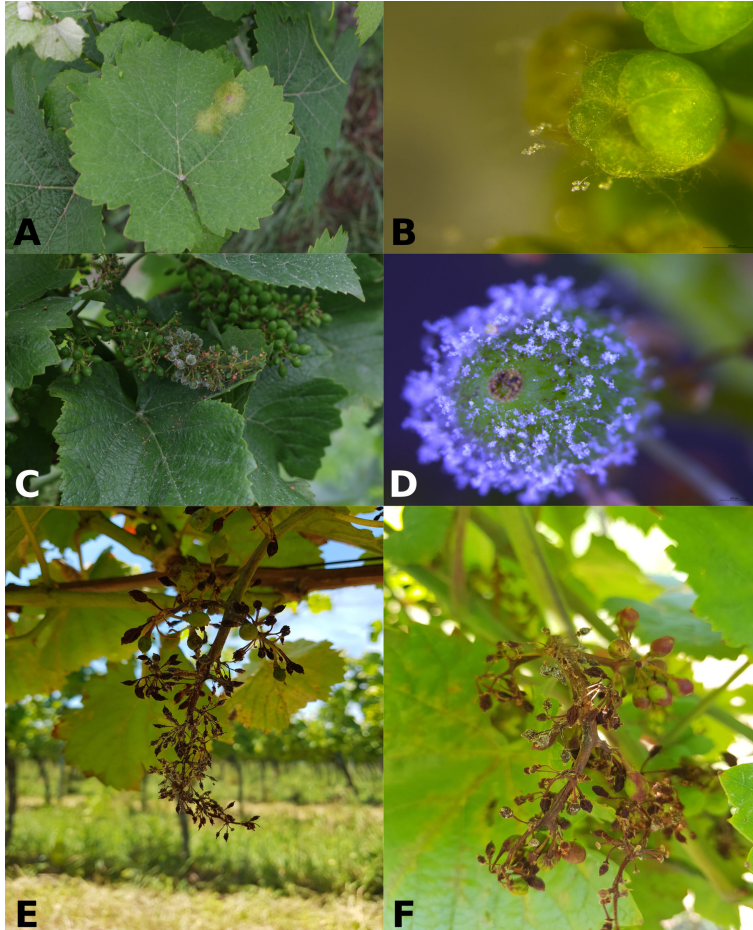


Abbildung 1.1: (A) Blattoberseite mit den typischen Anzeichen einer *P. viticola*-Infektion („Ölflecken“). (B) Befallene Blüte aus der bereits Sporangioophoren heraus wachsen. (C, D) Junge befallene Beeren im Feld (C) und als Nahaufnahme unter dem Stereomikroskop (D). (E, F) Fortgeschrittener Befall von Beeren, der durch das komplette Austrocknen derselben zum Ernteverlust führt.

Lebenszyklus von *P. viticola*

Der Lebenszyklus (Abb.: 1.1.2) von *P. viticola*, ein heterothallischer Oomycet, ist von zwei Fortpflanzungszyklen geprägt (Wong et al., 2001). Innerhalb des sexuellen Fortpflanzungszyklusses kommt es zur Bildung von Oosporen, die durch die Fusion von Gameten des heterothallischen Myzels entstehen (Schruff et al., 2013). Dieser Abschnitt beginnt im August bis September, wenn die Temperaturen unter 12°C sinken. Bisher ist noch nicht vollständig geklärt, wie die

Oosporen überwintern. Eine Vermutung ist, dass sie von den Blättern abfallen und im Boden bis zum Frühjahr verbleiben. Eine andere Meinung sagt aus, sie blieben an infizierten, nicht aus den Drahtrahmen entfernten Beeren oder Blättern zurück (Ellis, 2008). Es gibt aber auch Spekulationen über ein Überwintern in den Knospen. Dieses Verhalten ist bereits von anderen Pathogenen bekannt (z.B. *Erysiphe necator*) (Rügner et al., 2002; Rumbolz and Gubler, 2005; Hajjeh et al., 2008). Für all diese Behauptungen existieren jedoch keine klaren Beweise.

Im Frühjahr keimen die Oosporen aus und bilden Makrosporangien, welche die Zoosporen beinhalten. Diese lösen die Primärinfektion im Jahr aus, in dem die Zoosporen durch Spritzwasser an die Blattunterseite gelangen (Vercesi et al., 1999). Im Anschluss daran beginnt der asexuelle Lebenszyklus, der sich mehrere Male im Jahr wiederholt. Die freigegebenen Zoosporen der Primärinfektion gelangen durch ihre biflagellate (laterale) Begeißelung zu den Stomata und penetrieren diese, nach Abwerfen der Geißeln und Enzystieren, durch eine Primärhypse (Abb.: 1.3 A). Die Primärhypse wächst im Inneren der Atemhöhle und verzweigt sich mehrfach. Dabei bilden sich Haustorien aus, die über einen Penetrationpegel in die Zellen eingeführt werden und so für eine Nährstoffversorgung des Pathogens sorgen (Enkerli et al., 1997). Im weiteren Infektionsverlauf wachsen aus den Stomata Sporangioophoren (Abb.: 1.3 B), an deren Enden sich die Sporangien (Abb.: 1.3 C) befinden. Sie werden nach der Differenzierung durch das Luftplankton und Spritzwasser bis zum nächsten Wirt weiter getragen und ein neuer Zyklus beginnt (Lafon and Clerjeau, 1988; Schruft et al., 2013; Rossi et al., 2013).

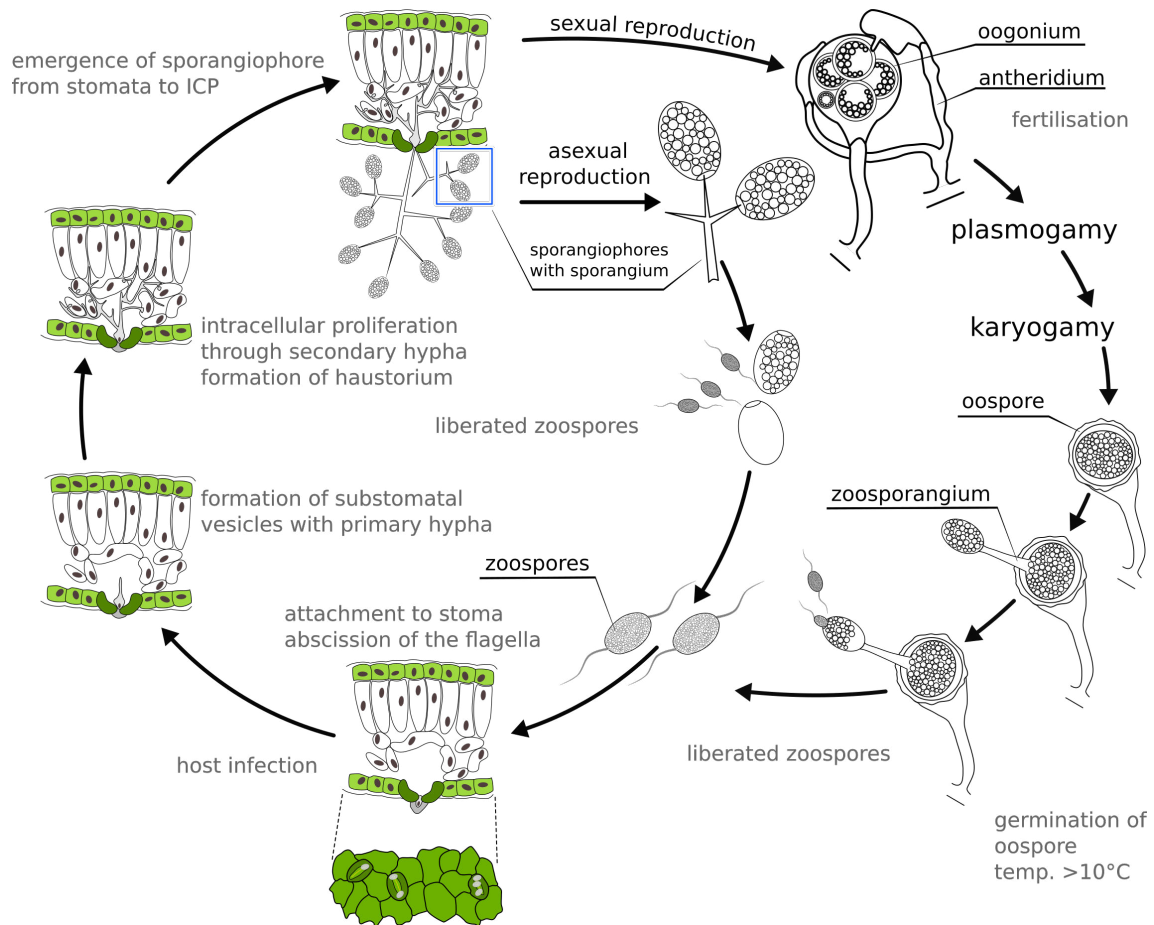


Abbildung 1.2: Sexueller und asexueller Fortpflanzungszyklus. Der sexuelle Zyklus beginnt gegen Ende des Jahres, wenn die Temperaturen sinken und vollendet sich im Frühjahr mit einer Primärinfektion. Daran schließt sich der mehrmals im Jahr wiederkehrende asexuelle Lebenszyklus an. ICP incubation period

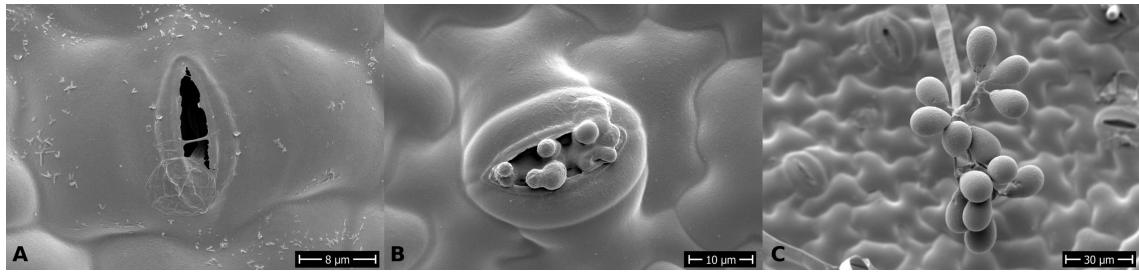


Abbildung 1.3: Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen einer *P. viticola* Infektion. (A) Zoospore an den Lippen eines Stoma, die mittels einer Penetrationshyphne über das Stoma in das Innere der Pflanze eingedrungen ist. (B) erste Sporangiophoren beginnen, aus dem Inneren heraus zu wachsen. (C) stellt eine voll entwickelte Sporangiophore dar, an deren Ende sich die Sporangien befinden. Die Aufnahmen sind in Zusammenarbeit mit dem Nano Imaging Lab der Universität Basel (Swiss Nanoscience Institute - Evi Bieler und Markus Dirrenberger) 2018 entstanden.

1.1.3 Bekämpfungsstrategien gegen *P. viticola*

Eines der ersten beschriebenen Pflanzenschutzmittel (1885) gegen *P. viticola* ist Kupferkalkbrühe (auch „Bordeauxbrühe“) (Muller and Sleumer, 1934). Die Kupferionen verhindern die Keimung der Sporen. Um eine vorbeugende Wirkung durch Kupferkalkbrühe zu erreichen, muss eine vorbeugende Ausbringung des Mittels erfolgen. Ähnliche Formen des Mittels als Kupferoxychlorid, Kupferoktanoat oder Kupferhydroxid, kommen heute noch im ökologischen Weinanbau zur Anwendung (Berkelmann-Löhnertz et al., 2010; La Torre et al., 2011).

Im integrierten (nicht ökologischen) Weinbau (Deutschland) werden acht Wirkstoffgruppen in einem Kombinationspräparat zur Vorbeugung von Resistenzbildung des Pathogens gegen Fungizide eingesetzt. Es handelt sich dabei um Fungizide, bei denen empfohlen wird, Präparate einer chemischen Wirkstoffklasse höchstens dreimal pro Saison anzuwenden (Staatliches Weinbauinstitut Freiburg, 2016).

1.2 Pathogen-Pflanze-Interaktion

Es existieren eine Vielzahl von Mikroorganismen, die auf Grund ihrer Pathogenität in der Lage sind, Pflanzen zu befallen und diese zu schädigen. Diese Organismen können Pathogene und Schaderreger aus den Gruppen der Bakterien, Viren, Pilze, Oomyceten, Nematoden und herbivoren Insekten sein (Heath, 1991; Agrios, 2005; Oh et al., 2006; Pieterse et al., 2012).

1.2.1 Pflanzliche Resistenz

Unter natürlichen Bedingungen ist die Großzahl der Pflanzen gegenüber den meisten potentiellen Pathogenen immun (Bell, 1981). Diese Eigenschaft der Pflanzen bezeichnet man als Basisresistenz oder auch Nicht-Wirtsresistenz (Heath, 2000; Prell and Day, 2001; Kamoun, 2001). Diese

Form der Resistenz ist auf die mangelnde Eigenschaft der Pathogene zurück zu führen, die ersten Abwehrbarrieren der Pflanzen zu überwinden. Für eine erfolgreiche Besiedelung der Wirtspflanzen fehlt es diesen Pathogenen an den notwendigen Pathogenitätsmerkmalen. Erst wenn ein Durchbrechen der Basisresistenz durch ein Pathogen stattgefunden hat, kann es zur Besiedelung der Pflanze kommen (Thordal-Christensen, 2003). Ab diesem Moment wird die Pflanze als Wirtspflanze bezeichnet. Diese Form der pflanzlichen Resistenz ist die bis heute am wenigsten verstandene (Mysore and Ryu, 2004).

Die Basisresistenz besteht aus einem mehrschichtigen Aufbau des Abwehrsystems. Wichtige Barrieren der Pflanzen sind hier die Behaarung, die Dicke der hydrophoben Wachsschicht, die Dicke der Zellwand sowie Actin-Filamente des Cytoskeletts aber auch der Aufbau der Spaltöffnungen (Kobayashi et al., 1997; Kortekamp and Zyprian, 1999; Jürges et al., 2009). Diese Arten der Barriere werden als präformierte Resistenz bezeichnet (Ferreira et al., 2006).

Bei der induzierten Resistenz dagegen kommt es unter anderem zur allosterischen Aktivierung bestimmter Enzyme. Dabei wird z.B. während des Penetrationsversuches des Pathogens Kallose zwischen der Zellwand und der Plasmamembran der Pflanze eingelagert (Bradley et al., 1992; Kauss et al., 1989; Messiaen et al., 1995). Weitere Effekte der induzierten Abwehr sind die Einlagerung von Lignin oder Suberin in die Zellwand (Hammerschmidt et al., 1984; Hammerschmidt, 1984; Walter, 1992; Hammerschmidt, 1985; Kolattukudy, 1985). Aber auch die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zählt dazu. Dazu gehören verschiedene Radikale wie Hydroxid-Radikale (OH^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hyperoxid-Anionen (O_2^-), um die Wichtigsten zu nennen (Scheel, 2002; Otte and Barz, 1996; Hammond-Kosack and Jones, 1996; Torres et al., 2006; Torres, 2010). Sie werden auch als Superoxide bezeichnet und sind in der Zellmembran lokalisiert, so dass sie schnell am Reaktionsort wirken können. Dabei wirken sie entweder direkt toxisch auf das Pathogen oder verstärken die pflanzliche Zellwand, indem eine Erhöhung der Quervernetzung durch verschiedene Glykoproteine eingeleitet wird (Peng and Kuc, 1992; Lamb and Dixon, 1997; Mittler, 2017). Die Superoxide sind sehr aggressiv und reaktionsfreudig. Einige von ihnen können zu einer irreversiblen Schädigung der Zellen führen. Die ROS sind an der Entwicklung einer hypersensitiven Reaktion (HR) beteiligt. Dabei kommt es zu einem lokalem Absterben der Pflanzenzellen die eingeleitet wird, um die Nährstoffversorgung des Pathogens zu unterbinden (Govrin and Levine, 2000; Dangl et al., 1996). Neben diesem programmierten Zelltod werden antimikrobielle Stoffe abgegeben. Diese hemmen die Ausbreitung des penetrierenden Pathogens und beschränken sein Wachstum (Jakobek and Lindgren, 1993; Greenberg, 1996; Dangl et al., 1996). Weiterhin gibt es bei der induzierten Resistenz PR-Proteine („pathogenesis related“-Proteine), deren Gene transkriptionell aktiviert werden, sobald es zu einem Pathogenbefall kommt. Von diesen Proteinen gibt es eine Menge verschiedener Untergruppen, die unterschiedliche Aufgaben erfüllen, auch teilweise noch mit unbekanntem Funktionen (Van Loon and Van Strien, 1999; van Loon et al., 2006).

1.2.2 Pathogenerkennung

Die Erkennung des Pathogens ist eine Grundvoraussetzung für die Aktivierung der Abwehrreaktion durch die Pflanze. Verschiedene Induktoren, sogenannte Elicitoren, vermitteln die Erkennung und damit auch die Einleitung der Abwehr (Ebel and Scheel, 1997, 1992). Dabei können unterschiedliche Elicitoren unterschieden werden (Eder and Cosio, 1994). Es wurden verschiedene Oligosaccharide, Glykoproteine, Proteine und auch Fettsäuren als auslösende Faktoren beschrieben (Parker et al., 1991; Sharp et al., 1984; Scholtens-Toma et al., 1989; Bostock et al., 1982;

West, 1981). Diese wurden aus unterschiedlichen Pflanzenpathogenen isoliert und die funktionelle Eigenschaft, die Fähigkeit zum Auslösen einer pflanzlichen Abwehr, nachgewiesen (Ebel and Scheel, 1997). Die verschiedenen Elicitoren besitzen meist hoch konservierte Erkennungssequenzen, die es dem pflanzlichen Immunsystem ermöglichen, die eindringenden Mikroorganismen zu erkennen. Diese Strukturen werden auch als „pathogen-associated molecular pattern“ (PAMPs), „microbe-associated molecular pattern“ (MAMPs) bezeichnet. Zusätzlich kann es zu Zellschädigung kommen welche ähnliche Signale senden. Diese werden auch als „damage-associated molecular pattern“ (DAMPs) bezeichnet (Jones and Dangl, 2006; Henry et al., 2012; Bittel and Robatzek, 2007). Sie stehen am Anfang der Aktivierung des Immunsystems der Pflanzen und zählen zur basalen Immunität. Die PAMPs und MAMPs können von membranständigen Rezeptoren, den „pattern recognition receptors“ (PRRs), erkannt werden und lösen im Anschluss an eine Pathogenerkennung eine Signalkaskade aus (Kauss, 1989; Zipfel, 2008). Diese ruft eine Abwehrreaktion hervor („PAMP triggered immunity“ PTI (Jones and Dangl, 2006; Zipfel, 2008; Chisholm et al., 2006). Häufig erfolgt innerhalb dieser Abwehrreaktion eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die schnell eine Aktivierung von spezifischen Genen („pathogenesis related“ genes - *PR*-Gene) erzielen oder die Wirkung dieser verstärken (Nuernberger and Lipka, 2005; Chisholm et al., 2006). Einige Pathogene umgehen diese Abwehr, indem sie z.B. Effektoren (*Avr*-Gene) in den Apoplast oder über die Haustorien in die Pflanzenzellen absondern. Dieser Teil der Pflanzenabwehr wird als „effector triggered susceptibility“ (ETS) bezeichnet. Dabei ist die Pflanze gegenüber dem angreifenden Pathogen weiterhin anfällig und ein Eindringen kann nicht gestoppt oder gehemmt werden (Speth et al., 2007; Xiang et al., 2008; Göhre and Robatzek, 2008). Einige Pflanzen können nun wiederum verschiedene *R*-Gene aktivieren. Am bekanntesten sind die NBS-LRR-Gene („nucleotide binding sites - leucine rich repeats“) (Lee and Yeom, 2015; Sekhwal et al., 2015; Zipfel, 2008). Sie erkennen spezifische Effektoren des Pathogens und leiten damit die „effector triggered immunity“ (ETI) ein. In diesem Fall ist die Pflanze resistent gegenüber dem angreifenden Pathogen (Jones and Dangl, 2006; Chisholm et al., 2006).

1.2.3 Pflanzliche Sekundärmetabolite - Stressmetabolite

Wie bereits erwähnt gibt es eine Reihe von Mechanismen, durch die sich Pflanzen vor Pathogenangriffen schützen können. Eine weitere wichtige Rolle innerhalb der induzierten Resistenz spielen die Phytoalexine, die unter anderem auch durch den Angriff verschiedener Mikroorganismen direkt nach der Infektion induziert werden. Zu den Phytoalexinen zählen Sekundärstoffe, die im Fall eines mikrobiellen Befalls die Ausbreitung und das Wachstum (oder die Vermehrung) des Pathogens in den Pflanzen hemmen oder verhindern. Diese niedermolekularen Substanzen wirken nur lokal an der Stelle des Befalls und sind im gesunden Gewebe in der Regel nicht nachweisbar. Sie sind frühestens 24 Stunden nach der Infektion im pflanzlichen Gewebe detektierbar und erreichen ihre maximale Konzentration nach ca. drei Tagen. Danach sinkt die Konzentration wieder ab (Bennett and Wallsgrave, 1994; Templeton and Lamb, 1988).

Eine wichtige Gruppe von Phytoalexinen bilden die Stilbene. Sie wurden bereits in verschiedenen Studien in Zusammenhang mit Pathogenabwehr gebracht (Schnee et al., 2008; Coutos-Thévenot et al., 2001; Godard et al., 2009). In Pflanzen kommen sie als freie Hydroxyverbindung, Methylester oder in glycosilierter Form vor. Das bekannteste Stilben der Reben ist Resveratrol. Dieses ist vor allem durch seine positiven Eigenschaften auf die menschliche Gesundheit bekannt geworden. Jedoch spielt es nicht nur im menschlichen Körper eine wichtige Rolle, wie z.B. in der Abwehr von Krebszellen, es nimmt auch im Abwehrmechanismus der Pflanzen eine wichtige Rolle ein (Iriti et al., 2004; Ahuja et al., 2012). Für den gesamten Abwehrprozess durch Stilbene nehmen

noch weitere Vertreter eine entscheidende Funktion ein. Seine oligomeren Derivate ϵ - und dessen Isoform δ -Viniferin spielen dabei ebenfalls eine sehr wichtige Rolle (Pezet et al., 2003). Bereits geringe Mengen des δ -Viniferins reichen aus, um eine antimikrobielle Wirkung zu erzielen. Dies zeigt sich durch die Hemmung der Zoosporenmobilität sowie der Sporangienentwicklung bei *P. viticola*, die bereits bei 15 μM stattfindet (Pezet et al., 2004). Mit den Pterostilbenen stellen diese vier Stoffe die wichtigsten Vertreter der Pathogenabwehr innerhalb der Sekundärmetabolite dar.

Die vermehrte Produktion von Stilbenen wird durch die Induktion von Stilbensynthasen (*STS*) hervorgerufen. Diese werden nicht kontinuierlich exprimiert, sondern durch einen Stressreiz, wie z.B. den Angriff durch ein Pathogen, in ihrer Transkription induziert (Gorham et al., 1995; Bezuashvili et al., 2019). Die Synthese der Stilbene findet über den Phenylpropanoid-Weg statt, der durch den Shikimate-Weg eingeleitet wird (Langcake and Pryce, 1977; Kiselev et al., 2009). Innerhalb dieses Weges wird zunächst die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) aktiviert (Zhao et al., 2005; Whetten and Sederoff, 1995). Man vermutet, dass deren kodierende Gene durch die Verwundung von Pflanzenzellen induziert werden. Dadurch kommt es zur Freisetzung von Sekundärmetaboliten. Über die Stimulation des zentralen Mediators p-Coumaroyl-CoA wird unter anderem die Produktion der verschiedenen Stilbene eingeleitet (Abb. 1.4) (Vogt, 2010; Chong et al., 2009).

Stilbene werden üblicherweise nach der Extraktion aus dem entsprechenden Probenmaterial (z.B. Blättern, Beeren) mit Methanol über eine HPLC detektiert (Grippi et al., 2008; Stecher et al., 2001; Gabaston et al., 2017).

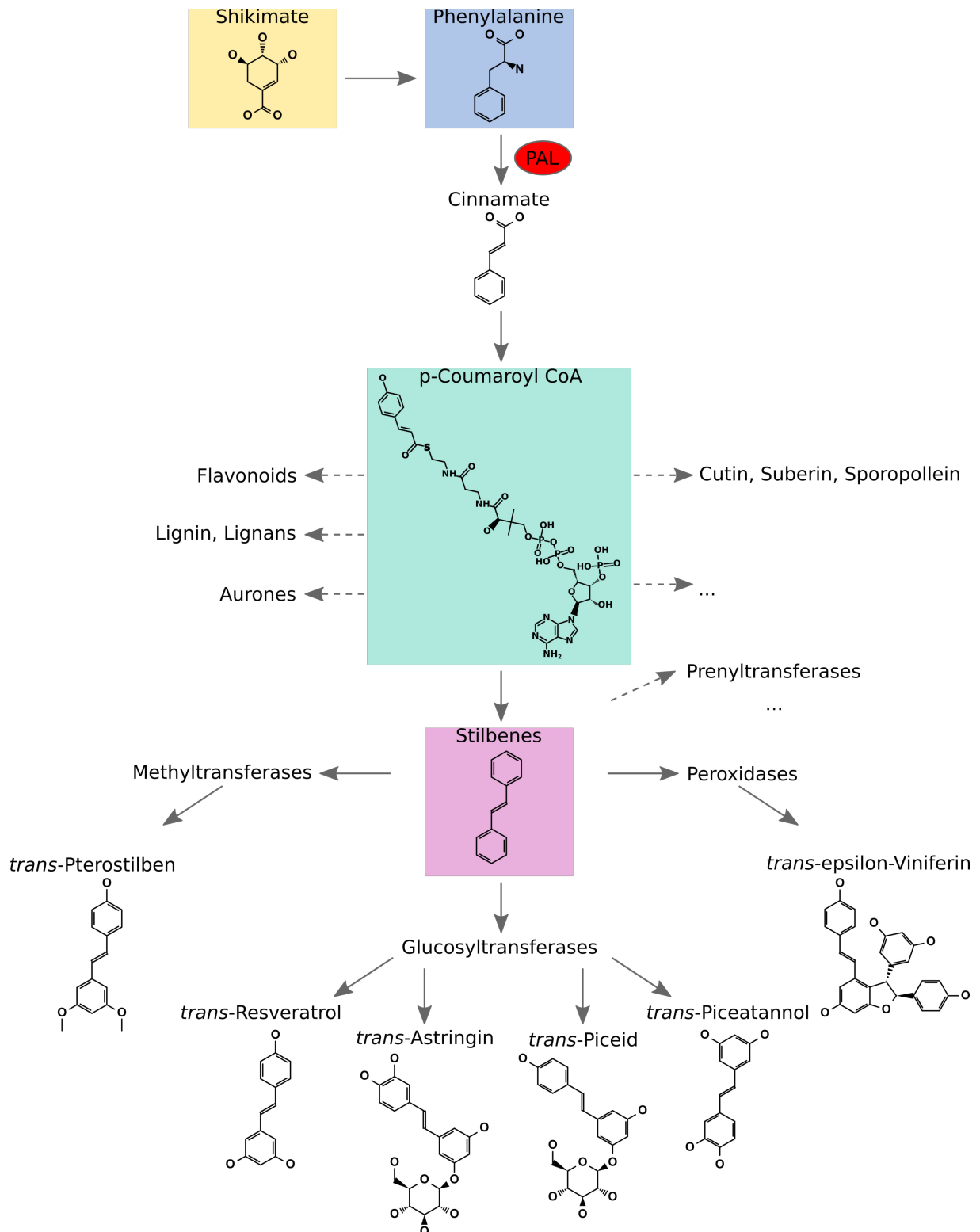


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Phenylpropanoid-Pathways. Dieser wird durch den Shikimate-Pathway eingeleitet und führt bei der Ausschüttung von Sekundärmetaboliten unter anderem zur Produkten der verschiedenen Stilbene.

1.3 Resistenzzüchtung bei Reben

Es wurde bereits beschrieben, dass alle kultivierten Reben die Spezies *V. vinifera* als genetischen Hintergrund besitzen, weshalb auch das Problem der hohen Anfälligkeit gegenüber zahlreichen Pathogenen besteht (This et al., 2006). Um dieses Problem zu minimieren, werden jährlich hohe Mengen an Fungiziden ausgebracht. Diese Menge ist im Vergleich zu anderen Nutzpflanzen bei der Weinrebe sehr viel höher, beachtet man dabei die Größe der Anbaufläche und die eingesetzte Menge an Fungiziden (Eurostat, 2007). Die periodische Ausbringung von Fungiziden birgt dabei einen hohen zeitlichen Mehraufwand sowie eine starke finanzielle Belastung für die Landwirte und Winzer. Auf der anderen Seite gelangen durch die ausgebrachten Fungizide verstärkt Schadstoffe in die Umwelt und gefährden die Grundwässer sowie Flora und Fauna (Komárek et al., 2010).

Auf Grund dieser Problematik ist die Züchtung im Weinbau bestrebt, neue widerstandsfähige Sorten zu züchten. Bei diesen neuen pilzwiderstandsfähigen (PIWI) Sorten macht man sich die Resistenzeigenschaften der amerikanischen oder auch asiatischen (nicht endemischen) Wildreben zu Nutze (Eibach et al., 2010). Diese Wildreben besitzen aus bisher noch unbekanntem Grund eine natürliche Resistenz gegen verschiedene Pathogene. Es wird z.B. vermutet, dass vor hunderten von Jahren die Wildreben in Asien durch die Anwesenheit eines ähnlichen Pathogens eine Co-Evolution durchgemacht haben. Danach könnten die Wildreben adaptiert gewesen sein und das auslösende Pathogen verschwand.

Anfang des 19. Jahrhunderts wurden erste Kreuzungsversuche zwischen den amerikanischen resistenten Wildreben und Kulturreben durchgeführt. Leider zeigte sich bei diesen ersten Versuchen, dass die resistenten Wildreben auch negative Eigenschaften einbringen. Zu diesen Eigenschaften zählen unter anderem Fehlgerüche, wenig Ertrag durch kleine oder wenig Trauben oder auch schlechte Wuchseigenschaften. Dadurch war man gezwungen, nach Erhalt der gewünschten Resistenz, eine Rückkreuzung mit Kulturreben durchzuführen. Dadurch brachte man die Weinqualität zurück (Alleweldt and Possingham, 1988).

Dieser Prozess bis zum Erhalt der gewünschten resistenten Sorte mit guter Weinqualität dauert 25 - 30 Jahre. Man versuchte, diesen Prozess zu verkürzen und veränderte damit die Kreuzungszüchtung grundlegend. So werden gezielt genetische Marker für die Selektion von Resistenzen entwickelt und eingesetzt (Töpfer et al., 2011a). Durch diese Marker können verschiedene Bereiche im *Vitis*-Genom mit bestimmten phänotypischen Merkmalen verknüpft werden. Die Marker kommen in identischer Kopie in allen Geweben der Pflanzen vor und sind dadurch unabhängig vom Entwicklungsstadium (Sefc et al., 2009). Die markergestützte Selektion (MAS) kann in jedem Entwicklungsstadium angewendet werden. Schon Sämlinge können auf ihre Merkmale und Eigenschaften getestet werden (Lande and Thompson, 1990). So ließe sich der Prozess bis zur Zulassung einer Sorte, durch frühzeitige Selektion nach der Kreuzung, um bis zu 10 Jahre verkürzen (Töpfer et al., 2011b). Diese SSR-Marker können durch die Berechnung von QTL-Analysen (Quantitative Trait Locus) aus Kreuzungspopulationen erstellt werden. Bei den Kreuzungspopulationen handelt es sich um Kreuzungen zwischen den europäisch heimischen anfälligen Kulturreben und z.B. den resistenten Wildreben. Dazu wird eine genetische Karte erstellt, die die Grundlage für eine QTL-Analyse ist. Dadurch lassen sich Orte auf dem Genom ermitteln, die an der Ausprägung des Merkmals (z.B. Resistenz) beteiligt sind. Weiterhin kann eine Segregation des Merkmals in der spaltenden Population untersucht werden. Diese Merkmalerfassung ist eine Grundvoraussetzung für die QTL-Analyse.

Um eine dauerhafte Resistenz in den neugezüchteten Sorten zu erhalten, werden verschiedene Kombinationen von Resistenzloki eingebracht. Dieser Vorgang ist wichtig, da die neu gezüchteten

Rebsorten 30 und mehr Jahre im Weinberg stehen (Dauerkulturen). Durch diese Pyramidisierung soll das Pathogen davon abgehalten werden, die Resistenzbarriere zu überwinden (Eibach et al., 2007; Eibach and Töpfer, 2010; Peressotti et al., 2010). Vorteil dieser Züchtung ist der verminderte Einsatz von Pflanzenschutzmitteln.

1.4 Der *Rpv10*-Lokus

Der Resistenzlokus *Rpv10* wurde 2012 durch QTL-Analysen am Julius Kühn-Institut, Institut für Rebenzüchtung in Siebeldingen identifiziert (Schwander et al., 2012). Dieser wurde aus einer Kreuzungspopulation (GF.GA-52-42 (*Rpv3.1*) x 'Solaris' (*Rpv10/Rpv3.3*)) (Abb.: 1.5) von 265 F₁-Individuen mit SSR-Markern (Welter et al., 2007; Vezzulli et al., 2008) genetisch kartiert (Schwander et al., 2012). Ursprünglich stammt der *Rpv10*-Lokus aus der asiatischen Wildrebe *Vitis amurensis* der von Seiten der Sorte 'Solaris' vererbt wurde. 'Solaris' selbst wurde 1975 am staatlichen Weinbauinstitut in Freiburg gekreuzt und wird als sehr pilzwiderstandsfähige Ertragsorte in Deutschland angebaut.

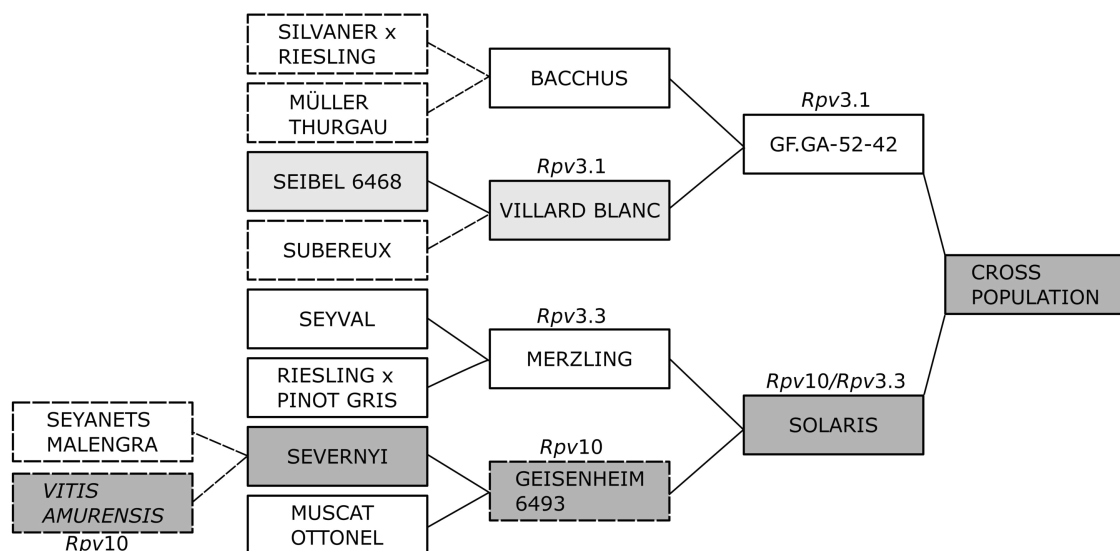


Abbildung 1.5: Stammbaum der Kreuzungspopulation GF.GA-52-42 x 'Solaris'. Der *Rpv3.3*-Lokus konnte in den QTL-Berechnung an 'Solaris' nicht errechnet werden (Schwander et al., 2012).

Für die Erstellung einer integrierten genetischen Karte wurden insgesamt 208 SSR-Marker verwendet. Sie bilden die Grundlage für die Berechnung der genetischen Karten durch Kopplungs-/Rekombinationsanalysen. Im Anschluss daran wurde eine QTL-Analyse durchgeführt. Dafür wurden zwei Methoden verwendet. Das ist zum einen das Interval Mapping (Lander and Botstein, 1989) und zum anderen das Multiple QTL Mapping (Jansen, 1993, 1994; Jansen and Stam, 1994). Bei diesen Berechnungen wurde ein sehr starker QTL auf der Kopplungsgruppe (LGs) 09 gefunden (Abb.: 1.6). Dieser QTL wurde durch 'Solaris' in die nachfolgende Generation eingebracht. Ursprünglich stammt dieser als *Rpv10*-Lokus bekannte Bereich aus der asiatischen

Wildrebe *Vitis amurensis*. Der QTL wurde feinkartiert und auf einen 79 kb großen Bereich, auf dem 12x PN40024-Referenzgenom (Jaillon et al., 2007), eingeschränkt (Schwander, 2012). Durch spätere Arbeiten konnte der *Rpv10*-Lokus durch PCR-Amplikons und die Erstellung von BAC-Klonen aus 'Solaris' sequenziert werden. Die PCR-Amplikons wurden aus Selbstungsnachkommen mit homozygotem *Rpv10*-Lokus amplifiziert. Aus den BAC-Klonen konnte die anfällige (81.508 bp) und resistente (83.656 bp) Haplophase des *Rpv10*-Lokus erschlossen werden und zudem eine vollständige Darstellung der Sequenz in diesem Bereich erfolgen (Dudenhöffer and Zyprian, unpubliziert).

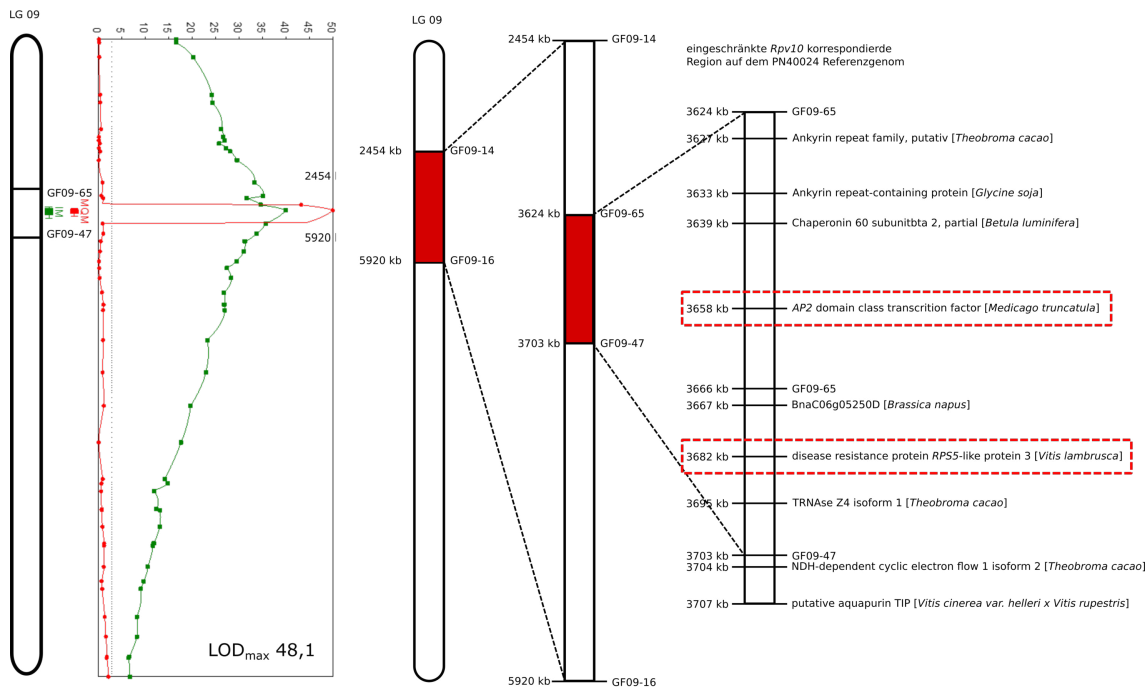


Abbildung 1.6: Darstellung des *Rpv10*-Lokus durch den berechneten QTL und Ort des Resistenzlokus auf dem Chromosom 9. Information über die im Lokus befindlichen Gene. F. Schwander (QTL) und S. Fröbel Chromosomen und Gene).

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist das Verständnis des Abwehrmechanismus und die Identifikation der beteiligten *R*-Gene im *Rpv10*-Lokus. Dazu wurden Kandidatengene aus dem Resistenzlokus isoliert, kloniert und in anfällige Sorten transformiert. Die transformierten Reben sollen zu Ende des Projektes funktionell überprüft werden. Durch mikroskopische Untersuchungen nach experimenteller Inokulation sollten die Resistenzmechanismen verschiedener Genotypen charakterisiert werden. Dazu kamen Programme zum Einsatz, die einen objektiven Vergleich der mikroskopischen Aufnahmen erlauben. Unterstützend dazu wurden zu ausgewählten Zeitpunkten Stilben-Analysen an gleichen Genotypen durchgeführt. Sie dienen ebenfalls der Aufklärung der

vermittelten Resistenz durch den Locus. Zu diesen praktischen Methoden kamen verschiedene bioinformatische Analyse-Methoden zum Einsatz, die eine genaue *in silico* Charakterisierung erlauben. Dabei wurden besonders die Kandidatengene untersucht. Durch die Auswertung einer RNA-Seq-Analyse an *Rpv10*-tragenden Genotypen (homozygot, heterozygot) im Vergleich mit einem anfälligen Genotypen, sollte eine Bestimmung der beteiligten Gene und Gene-Cluster vorgenommen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Software und Datenbanken

Tabelle 2.1: Software und Tools.

Software	Version	Hersteller	Firmensitz	Referenz
Eclipse blastx, blastn, CD-Search	Neon 4.6	Eclipse Foundation NCBI	Ottawa, Canada Bethesda MD, USA	(Altschul et al., 1990)
CLC Main Workbench, CLC Genomics Workbench	8.1., 6.5.1.	QIAGEN Bioinformatics	Redwood City CA, USA	
FGENESH		Softberry	Mount Kisco, NY, USA	(Solovyev et al., 2006), (Solovyev et al., 2010)
Gramene		Cold Spring Harbor Laboratory, Oregon State University, EMBL-EBI		
Cribi		Genomics and Bioinformatics Unit, University of Padua	Corvallis, Oregon, USA	
RStudio	3.3.2	RStudio, Inc.	Boston, MA, USA	(Core Team, 2018)
FastQC Throughput Sequence QC Report	0.11.2	Babraham Bioinformatics		
Tm Calculator		Thermo Fisher Scientific™		
CLARIOstar Reader Control, MARS Data analysis		BMG LABTECH		
SOGO Database		Institute of Crop Science, NARO		(Higo et al., 1999)
PlantCare Database		University Gent		(Lescot et al., 2002)
miRBase Database		The University of Manchester		(Stanke et al., 2006), (Stanke et al., 2008), (Keller et al., 2011)
AUGUSTUS	3.3.1	OmicX Seine Innopolis, Frankreich		(Sperschneider et al., 2016) (Sperschneider et al., 2018)
EFFECTORP.2	2.0	Jana Sperschneider		(Sperschneider et al., 2011), (Armenteros et al., 2019)
APOPLASTP.1	1.0	Jana Sperschneider		(Wang and Zhang, 2009), (Pang et al., 2011)
SignalP.5	5.0	DTU Bioinformatics, Department of Bio und Health Informatics		
WinRhizo Pro	1.0	Regent Instruments inc.	Canada	

2.1.2 Geräte

Tabelle 2.2: Analysegeräte.

Gerät	Hersteller	Firmensitz
ABI 9700 Thermocycler	Applied Biosystems®	Darmstadt, Germany
Mastercycler@personal		
Mastercycler@gradient	Eppendorf AG, Hamburg	Hamburg, Germany
Thermomixer compact		
Mikroliterzentrifuge Z160M	Hermle	Wehingen, Germany
Tischzentrifuge 6 16KS	Sigma	Osterode am Harz, Germany
Laborzentrifuge 2K15		
Brutschrank B20	Heraeus Instruments	Hanau, Germany
Schüttelinkubator 3031	GFL mbH	Burgwendel, Germany
Klimakammer	Weisshaar GmbH & Co. KG	Bad Salzuflen, Germany
EC330 Midi Cell und EC360 Maxi Cell	E-C Apparatus Corporation,	Woonsocket, USA
Electrophoretic Gel System		
QUANTUM ST5 und UV Leuchttisch	Vilber Lourmat GmbH	Eberhardzell, Germany
Genie 2™Vortex - Mischer	Scientific Industries	Bohemia, NY USA
Präzisionswaage M-power AZ3102	Sartorius mechatronics	Göttingen, Germany
Feinwaage ABJ-NM/ABS-N	Kern & Sohn	Balingen, Germany
Wärmeschrank	Memmert	Schwabach, Germany
Lyo Cube 4-8 Gefriertrocknung	Christ	Osterode am Harz, Germany
Alpha 1-4 LSC Gefriertrocknung		
Sterilbank Safe 2020 Class II Bio. Safty Cabinet	Thermo Fisher Scientific™	Waltham, MA USA
Tisch Autoklav Systec DX-23	Systec the autoclave company	Linden, Germany
CLARIOstar®-Photometer	BMG Labtech GmbH	Ortenberg, Germany
Fluoreszenzmikroskop DM4000B		
Stereomikroskop Leica M205FA	Leica	Wetzlar, Germany
Neubauer Zählkammer		
Puncher	Marienfeld	Lauda Königshofen, Germany
Kinetex Reversed Phase C18 - Säule (100 mm × 2.1 mm × 2.6 µm)	Harris Uni-Core, Hole 3 mm	
Tissue Lyser mill	Phenomenex	Aschaffenburg, Germany
7500 Fast Real-Time PCR System	QIAGEN GmbH	Hilden, Germany
	Applied Biosystems®	Darmstadt, Germany

2.1.3 Kits

Tabelle 2.3: Analysekits.

Kit	Anwendung	Hersteller	Firmensitz
pegGOLD Plant DNA mini Kit	gDNA Extraktion	peqlab	Diepoldsau, Germany
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	PCR-Produkt-Aufreinigung	Macherey-Nagel	Düren, Germany
Spectrum™ Plant total RNA Kit	Gesamt RNA Extraktion aus Blättern	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Germany
In-Fusion® HD Cloning Plus CE	Klonierung der PCR-Produkte	Takara	Saint-Germain-en-Laye, France
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Plasmidpräparation		
Power SYBR® Green PCR Master MIX	qRT-PCR	Thermo Fisher Scientific™	Waltham, MA USA
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	cDNA Synthese von gesamt RNA	Applied Biosystems	Foster City, California, USA

2.1.4 Enzyme, Antibiotika und andere Substanzen

Tabelle 2.4: Enzyme und Substanzen.

Enzym/Substanz	Verwendung	Hersteller	Firmensitz
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Amplifikation der Kandidatengene	Thermo Fisher Scientific™	Waltham, MA USA
Polyvinylpyrrolidone PVP	RNA-Extraktion	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Germany
Stilbenstandards (Astringin, Piceid, Piceatannol, Resveratrol, ϵ -Vineriferin, Pterostilben)	Referenzsubstanzen für HPLC	PhytoLab GmbH Co. KG	Vestenbergsreuth, Germany
<i>Bgl</i> III	Restriktion	Thermo Fisher Scientific™	Waltham, MA USA
Agar	Blattscheiben Tests	Gustav Essig GmbH & Co. KG	Mannheim, Germany
Agar	Nährmedienherstellung	Agar Bacteriology grade, PanReac AppliChem ITW Reagents	Darmstadt, Germany
Agarose	Gelelektrophorese	Axon Labortechnik	Kaiserslautern, Germany
Gene Ruler Low Range DNA Ladder	Größenmarker Gelelektrophorese	Thermo Fisher Scientific™	Waltham, MA USA
Gene Ruler DNA Ladder Mix	Größenmarker Gelelektrophorese	Thermo Fisher Scientific™	Waltham, MA USA
10 x Thermopol Puffer	Decapping von mRNA	New England Biolabs	Frankfurt am Main, Germany
RppH	Decapping von mRNA	New England Biolabs	Frankfurt am Main, Germany
Ribolock	Decapping von mRNA und Ligation	Thermo Fisher Scientific™	Waltham, MA USA
T4-RNA-Ligase	Ligation	Thermo Fisher Scientific™	Waltham, MA USA
DMSO	Ligation	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Germany
BSA	Ligation	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Germany

Tabelle 2.5: Antibiotika für Medien. Alle aufgelisteten Hersteller haben ihren Firmensitz in Darmstadt, Germany.

Antibiotika	Hersteller
Ampicillin (Amp)	AppliChem,
Spectinomycin (Spec)	
Rifampicin (Rif)	Sigma-Aldrich®
Kanamycin (Kan)	
Chloramphenicol (Cm)	Calbiochem

2.1.5 Vektor

Tabelle 2.6: Vektoren für Klonierungsarbeiten.

Vektor	pLH9070 (Hausmann and Töpfer, 1999)
Selektion	Spectinomycin (Spec) (Bakterium) Kanamycin (Kan) (Pflanzen) Phosphinothricin (Pflanzen)
Cloning site	MCS
ORI	pVS1 ColE1

2.1.6 Bakterienstämme und BAC-Klone

Tabelle 2.7: *E. coli* Stämme für Klonierungsarbeiten.

Stamm	Genotyp
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>fhuA2, lac(del)U169, phoA, glnV44, F80', lacZ(del)M15, gyrA96, recA1, relA1, endA1, thi 1, hsdR17</i>
<i>E. coli</i> Stellar™	<i>F-, endA1, supE44, thi 1, recA1, relA1, qyrA96, phoA, ϕ80d lacZΔ M15, Δ(lacZYA argF) U169, Δ(mrrhsdRMS mcrBC), Δ mcrA, λ-</i>
<i>E. coli</i> HB101 pRK2013	<i>F, Lambda, araC14, leuB6(Am), DE(gpt proA)62, lacY1, glnX44(AS), galK2(Oc), recA13, rpsL20(strR), xylA5, mtl 1, thiE1, hsdS20(rB, mB)</i>

Tabelle 2.8: *A. tumefaciens* Stämme für Pflanzentransformation.

Stamm	Resistenz	Ti-Plasmid	Referenz
EHA101	Rif (chromosomaler Resistenzmarker), Kan ^r	pEHA101 (pTiBo542DT-DNA)	(Hood et al., 1986)
EHA105	Rif (chromosomaler Resistenzmarker)	pEHA105 (pTiBo542DT-DNA)	(Wang and Ge, 2005)

Tabelle 2.9: Auflistung aller verwendeten BAC-Klone (Dudenhöffer, 2016) im Vektor pCUGI-BAC1 (Luo et al., 2001) mit dem Selektionsmarker Kanamycin.

Klon	Allel	Länge [bp]
BAC_11G10	anfällig	128.573
BAC_40B07	anfällig	102.735
BAC_17M19	resistent	106.371
BAC_19A23	resistent	106.531

Die BAC-Klone waren aus der Sorte 'Solaris' erzeugt worden und enthalten jeweils den *Rpv10*-Lokus im resistenten bzw. anfälligen Haplotyp.

2.1.7 Pflanzenmaterial

Tabelle 2.10: Rebsorten für Mikroskopie- und Stilbenanalyse. Auflistung aller Genotypen für die verschiedenen Tests, die als Stecklinge für die mikroskopischen Analysen sowie für die Stilbenanalysen angezogen wurden.

Sorte	Resistenz-Lokus	Anfälligkeit
'Gutedel'	-	++
'Sibera'	<i>Rpv10</i> , <i>Rpv3.3</i>	-
'Solaris'	<i>Rpv10</i> , <i>Rpv3.3</i>	-
'Rondo'	<i>Rpv10</i>	-
'Golubok'	<i>Rpv10</i>	-
'Merzling'	<i>Rpv3.3</i>	-
'Saphira'	<i>Rpv3.3</i>	-

Der *Rpv3*-Lokus befindet sich auf Chromosom 18 (begrenzt durch die Marker GF18-06 und GF18-08) und wurde durch Fischer et al. (2004) und Welter et al. (2007) charakterisiert und beschrieben. Es gibt mehrere allelische Varianten dieses Lokus (*Rpv3.1*/ *3.2*/ *3.3*.) Der *Rpv3.3* wurde kürzlich von Vezzulli et al. (2019) beschrieben. Dieser wird an 'Solaris' von 'Merzling' über 'Seyval' wahrscheinlich vererbt. Seine Resistenzeigenschaft ist sehr schwach und wurde deshalb erst spät charakterisiert. Da sich dieser Resistenzloкус in 'Solaris' befindet, ist der Versuchsaufbau daran angepasst, wird jedoch nicht als Hauptschwerpunkt behandelt.

2.1.8 Nährmedien

Tabelle 2.11: Zusammensetzung LB-Medium [1L].

Komponente	Menge
NaCl	5 g
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
ddH ₂ O	ad 1 L
für feste Nährmedien Bacto Agar	15 g

Je nach Bedarf erfolgte nach dem Abkühlen der Nährmedien auf 50°C die Zugabe der entsprechenden Antibiotika. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen von Antibiotika im Medium verwendet.

2.1.9 Färbelösungen

Tabelle 2.12: Anilin-Blau-Färbung (Unger et al., 2007; Hood and Shew, 1996).

Komponente	Menge/Volumen
KOH	1 N
Anilin-Blau	0,05% v/v
K ₂ HPO ₄	0,067 M

Tabelle 2.13: Trypanblau-Lebend-Farblösung (0,5%) mit einem End-pH-Wert von 8 - 9.

Komponente	Menge/Volumen
NaCl	0,9%
Trypanblau	0,5 g/100 ml

Tabelle 2.14: Calcofluor White-Färbung (Sigma-Aldrich, 1984) [1L].

Komponente	Volumen [g]
Calcofluor White M2R	1
Evans blue	0,5
ad 1 L 10 % KOH	

2.1.10 Puffer

Tabelle 2.15: 50x TAE [1L] mit einem End-pH-Wert von 8,3.

Komponente	Menge/ Volumen
Tris	242 g (2M)
Eisessig	57,1 ml (1M)
EDTA (0,5 M) pH 8,0	100 ml (mM)
ddH ₂ O	ad 1 L

Tabelle 2.16: 1x TE.

Komponente	Menge [mM]
Tris-Cl	10
EDTA pH8,0	1

2.1.11 Isolation von Plasmid-DNA nach Birnboim and Doly (1979)

Tabelle 2.17: Plasmid-Isolutions-Lösung I mit einem End-pH-Wert von 8,0 zur Resuspension.

Komponente	Menge [mM]
Glukose	50
Tris	25
EDTA	10

Tabelle 2.18: Plasmid-Isolutions-Lösung II. Lyse der Zellen durch alkalische Denaturierung.

Komponente	Menge
NaOH	0,1 N
SDS	1 %

Für Lösung III wurde 3 M K-Acetat hergestellt und ein pH-Wert von 4,8 mit Eisessig eingestellt. Dadurch kommt es zur Neutralisation des Reaktionsgemisches.

Tabelle 2.19: Plasmid-Isolutions-Lösung IV - Fällungsreagenz mit einem End-pH-Wert von 7,5.

Komponente	Menge [mM]
Tris	50
Na-Acetat	100

Tabelle 2.20: Puffer für RNase-Lösung.

Komponente	Menge [mM]
Tris (pH 7,5)	10
NaCl	100

Die Reagenzien aus Tabelle 2.20 wurden angesetzt und autoklaviert. Anschließend wurden 20 mg/ml RNase A gelöst. Danach wurde die RNase-Lösung für 15 Minuten bei 100°C gekocht, um DNasen zu inaktivieren. Die Lösung IV (5 ml) wurde mit RNase-Lösung (25 μ l) gemischt. Die Endkonzentration von RNase A in Lösung IV beträgt 100 mg/ml.

2.2 Methoden

2.2.1 Bioinformatische Analyse der Kandidatengensequenzen

Für die JAVA-basierte Programmiersprache wurden die Sequenzmotive aus den Publikationen, teilweise aus schon vorhandenen Mustern, teilweise aus Sequenzen in regulären Ausdrücken beschrieben. Zum Verständnis der Ausdrücke dient Tab.: 2.21.

Tabelle 2.21: Symbolik eines regulären Ausdrucks.

Symbol	Beschreibung
()	innerhalb der Klammern befindet sich ein Ausdruck, der genau ein Motiv ausdrückt
.	eine beliebige Aminosäure
{n}	n Anzahl der Positionen
	'ODER'-Verknüpfung
,	Anzahl von-bis-Positionen (z.B. 2,4) im Zusammenhang mit einer 'ODER'-Verknüpfung,
[]	eine der Aminosäuren innerhalb der Klammern kann genau an dieser Position vorkommen

Kernimportsignale

In der Publikation von Kosugi et al. (2009) wurden insgesamt sechs Klassen von Kernimportsignale (NLS) beschrieben, darunter ein bipartites (Klasse 6) und zwei nicht klassische NLS (Klasse 3 und 4), die von Importin α erkannt werden können. Die zweite Klasse wurde bereits in Pflanzen identifiziert (Raikhel, 1992). NLS, also Proteinkomplexe binden an die spezifischen Motive und ermöglichen so den Transport von Proteinen aus dem Zytoplasma durch die Kernporen in dem Nukleus. Die Position des NLS innerhalb des Proteins ist nicht festgelegt und bleibt auch nach dem Import des Proteins in den Nukleus erhalten. Bei dem Vorkommen von bipartiten NLS müssen beide Teilkomponenten vorhanden sein, um die Funktion ausführen zu können.

Die beschriebenen NLS-Klassen, auch als Sequenzmuster bezeichnet, wurden in ein für die Programmiersprache JAVA verständlichen „regulären Ausdruck“ definiert (Abb.: 2.1). Diese Muster wurden in den unterschiedlichen Haplotypen der beiden Kandidatengene gesucht, um eventuelle Unterschiede in der Verteilung der Muster zwischen den kodierenden Proteinen des anfälligen und resistenten Haplotypen zu finden und damit schon einen Hinweis auf eine funktionelle Veränderung zu bekommen (Kosugi et al., 2009; Raikhel, 1992).

```

1 private static final String CLASSONE = "(KR[K|R]R)|(K[K|R]RK)";
2 private static final String CLASSTWO = "[P|R].{2}KR[^DE][K|R]";
3 private static final String CLASSTRHEE = "KR.[W|F|Y].{2}AF";
4 private static final String CLASSFOUR = "[R|P].{2}KR[K|R][^DE]";
5 private static final String CLASSFIVE = "LGKR[K|R][W|F|Y]";
6 private static final String BIPARTITE = "(KR.{10,12}K[K|R][K|R])|(
    KR.{10,12}K[K|R].[K|R])";

```

Abbildung 2.1: Die sechs NLS-Klassen als „regulärer Ausdruck“ für die Motivsuche definiert.

Nucleotide Binding Site (NBS) Motive

Pan et al. (2000) beschrieb in seiner Publikation die NBS-LRR-Domänen von *R*-Genen als einen starken Bezug von Interaktion zwischen Pathogen und Pflanze. Durch seine Analysen konnte er Sequenzen identifizieren, die signifikante Homologien zu Genen aufweisen, die eine spezifische Resistenz gegen verschiedene Krankheitserreger vermitteln. Diese Sequenzen wurden in NBS-Motiven beschrieben. Insgesamt wurden neun Klassen in der Publikation untersucht, die jedoch nicht alle das gewünschte Ergebnis lieferten. Für die Analyse am Kandidatengen *Rpv10#1* wurden aus den Sequenzinformationen der Publikation fünf Motive in allgemeine Such-Pattern umgewandelt (Abb.: 2.2). Diese wurden für die Suche und Identifizierung auf beiden Haplotypen angewandt (Pan et al., 2000).

```

1 private static final String NBSI =
2 "(GG[V|T|W|S|L|M]GKTT[L|T|I|M]");
3 private static final String NBSIII =
4 "(K[R]K[R][V|I|F|Y]LDD[V|I])";
5 private static final String NBSIV_gr1 =
6 "(GS[R|K|T][I|V][T|V|I][I|A|T|V]T{2}[R|K])";
7 private static final String NBSVI =
8 "(G[K]G[L|N]P[L|K][A|P][L|P])";
9 private static final String NBSIX =
10 "(F[L|F|A][H|D|Y][I|C]A[C|W|L|F])";

```

Abbildung 2.2: Die fünf NBS-Klassen wurden als „regulärer Ausdruck“ für die Motivsuche definiert.

Leucine Rich Repeat (LRR) Motive

Beide Publikationen beschreiben die Pflanzenabwehr, in dem die LRR-Domäne eine zentrale Rolle einnimmt. Es wurden drei Sequenzmotive für die Analyse ausgewählt. Diese wurden auf das Kandidatengen *Rpv10#1* (für beide Haplotypen) angewandt.

Das erste Motiv wird als „LRR-core Motiv“ bezeichnet und wurde in Pflanzen, Tieren und Pilzen gefunden. Dieses Motiv steht in mitten einer LRR-Domäne und kann dort mehrfach hintereinander auftreten. Davon ausgehend können verschiedene Erweiterungen („LRR-core Motiv

extended“) vorgenommen werden. Darunter findet sich auch eine Erweiterung für das Resistenzgen *Rpv10#1* (Abb.: 2.3 unteres Motiv) (Jones and Jones, 1997; Warren et al., 1998).

```

1 private static final String LRR_core_motif =
2 "(.{2}L.L.{2})";
3 private static final String LRR_core_motif_extended =
4 "(L.{2}L.L.{2}L)";
5 private static final String LRR_core_motif_extended_RPS5 =
6 "(L.{2}L.L.{5}L)";

```

Abbildung 2.3: Die fünf LRR-Klassen wurden als „regulärer Ausdruck“ für die Motivsuche definiert.

Motive von Peptidsegmenten in Nucleotide Binding Sites (NBS)

In der Publikation von Traut (1994) wurden neun Motive von Peptidsegmenten beschrieben (Abb.: 2.4), die innerhalb einer NBS gebildet werden können und diese charakterisieren. Darunter befinden sich vier Motive für die Bindung von Kinasen (Kinase-1a, -2, -3a, -3b). Zwei Motive zeigen eine separate regulatorische Bindestelle für ATP (Regulatory-1, -2) und drei Sequenzmotive bilden eine Bindungsstelle für Nucleosidmonophosphate (NMP) (NMP-1, -2, -3b). NMP bindet ausschließlich Guanosinmonophosphat (GMP). Damit spielen die Motive eine wichtige Rolle in regulatorischen Prozessen der Zelle (Traut, 1994).

```

1 private static final String Kinase_1a =
2 "( [G|A|S|N] .{4} [G|A|C|S] K [G|S|T|V|A|P] [T|S|A|D|G|N|M] )";
3 private static final String Kinase_2 =
4 "( [V|G|I|L|N|T|A|Y|K] [A|F|L|I|G|D|E|T|C|K|P] [A|L|I|G|V|S|P|E|F|H] [L|G|V|I|T|D|F|Q|M|Y|K] D )";
5 private static final String Kinase_3a =
6 "( [E|A|G|P|F] [T|S|G|F] .{3} [Y|R] )";
7 private static final String Kinase_3b =
8 "( NK . [D|W] )";
9 private static final String NMP_1 =
10 "( [L|I|V|K|E|S] [S|L|Y|A] [T|S|A|V|L] [G|S|T|R|N|K] [D|R|F|H] [L|M|T|P] [L|F|P|E|Q|R] )";
11 private static final String NMP_2 =
12 "( [K|E|G|M|V|C|S|P|Q] [L|I|F|Y|K|Q|S] [V|L|I|K|D|E|T|Q] . [D|E|L|I|G|N|S|I|T] [D|E|Q|A] )";
13 private static final String NMP_3a =
14 "( G [F|Y|T|S] [Q|S|T] [R|V] .{3,4} Q )";
15 private static final String Regulatory_1 =
16 "( [V|L|F|E] [E|G|F|Q] [A|G|I] [I|G] .{3,5} [V|A|L|Y|T] . [E|D|S] )";
17 private static final String Regulatory_2 =
18 "( [K|R] .{3,6} [K|R|M] .{16,33} [R|K|N|Q] Y .{3,5} [K|D|R] [R|Y|K|N|F] )";

```

Abbildung 2.4: Die neun Motive von Peptidsegmenten-Klassen wurden als „regulärer Ausdruck“ für die Motivsuche definiert.

Vergleich anfälliger und resistenter Haplotypen des Kandidatengens *Rpv10#1*- Unterschiede in der DNA-Sequenz zur Aminosäuresequenz

Nach Vorhersage der funktionellen Domänen durch das Online Tool „Conseverd Domain Search“ (CD-Search) des NCBI wurde zunächst ein Vergleich der Domänen auf Ebene der DNA zwischen dem anfälligen und dem resistenten Haplotypen durchgeführt. Im Anschluss wurde die DNA-Sequenz in die Proteinsequenz translatiert. Verglichen werden die DNA-Sequenzen und die von ihnen kodierte Proteinsequenzen. Dadurch konnten Aussagen zu „silent“-Mutationen und „missense“-Mutationen mit oder ohne Änderung der Aminosäureeigenschaft gemacht werden.

Promotor-Analysen

Die Promotor-Analysen wurden mit zwei verschiedenen Software Tools durchgeführt: („SOGO“ (Higo et al., 1999) und „PlantCare“ (Lescot et al., 2002), Tab.: 2.1) und für beide Haplotypen verglichen. Die resultierenden Promotorelemente wurden anhand ihrer Funktion sortiert. So wurden Elemente, die direkt oder indirekt mit Pathogenabwehr in Verbindung stehen, auf dem codogenen Strang annotiert. Das wurde für beide Haplotypen durchgeführt, so dass ein Vergleich zwischen den Promotorregionen erarbeitet werden konnte.

2.2.2 Blattscheiben Tests

Die Blattscheiben-Assays wurden sowohl für die Infektionsversuche mit anschließender Mikroskopie, als auch für die Stilben-Analysen benötigt. Von den entsprechenden Versuchspflanzen wurde das zweite bis vierte Blatt basiseptal der Tiesspitze entfernt. Diese Blätter wurden anschließend mit sterilem Wasser gereinigt. Im Anschluss wurden mit einem im Durchmesser acht mm großem Korkbohrer Blattscheiben aus den einzelnen Blättern ausgestanzt. Dabei wurde darauf geachtet (abhängig vom Versuch), dass starke Blattadern ausgespart wurden. Die vorbereiteten Blattscheiben wurden mit der Blattunterseite nach oben auf 1 %-Wasseragar aufgelegt. Nach Vorbereiten der Sporangiensuspension wurden drei Tropfen von 10 μl auf die Blattscheibenunterseite aufgebracht. Die Inkubation erfolgte über acht Stunden in Dunkelheit und 22°C (Luftfeuchtigkeit (rF) 85 %). Im Anschluss daran wurde die Sporangiensuspension mit einem Filterpapier abgezogen, ohne die Blattoberfläche zu berühren. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Blattscheiben vom Agar entnommen und entsprechend der Analyse oder Studie vorbereitet. Die Inkubation der Blattscheiben erfolgte während der Versuchszeiträume unter gleichen Bedingungen im Klimaschrank. Es wurde ein Programm erstellt, welches die optimalen Wachstumsbedingungen von *P. viticola* schafft. Der Tag-Nacht-Rhythmus wurde mit 16 Stunden (Licht) und acht Stunden (Dunkelheit) mit jeweils 24°C und 22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 85 % in beiden Phasen gewählt.

2.2.3 Trypanblau-Lebend-Färbung

Zunächst wurde eine 0,9 % NaCl-Lösung hergestellt. In 100 ml der Lösung wurden anschließend 0,5 g Trypanblau gelöst. 64 μl der Sporangiensuspension wurden mit 36 μl der Trypanblau-Lösung vermischt und anschließend 10 μl in die Neubauer-Zählkammer überführt. Vollständig

blau stellen sich die nicht lebenden *P. viticola*-Sporen dar. Transparent mit blauem Schein sind die lebenden Sporen zu erkennen, die ausgezählt wurden.

2.2.4 Anilin-Blau-Färbung

Zu Beginn wurde eine 1 %ige Anilin-Blau-Stammlösung hergestellt. Dazu wurde 1 g Anilin-Blau in 100 ml Wasser gelöst. Weiterhin wurde eine 0,1 M Stammlösung von K_2HPO_4 hergestellt. Aus beiden Stammlösungen wurde im Anschluss eine 0,05 % Anilin-Blau-Lösung hergestellt. Die Blattscheiben wurden zwei Stunden mit 1N KOH bei 65°C entfärbt. Anschließend wurden die Proben dreimal in deionisiertem Wasser gespült. Die gespülten Blattscheiben wurden auf einen Objektträger positioniert, mit Anilin-Blau benetzt und mit einem Deckglas abgedeckt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 15 Minuten wurde die Färbelösung abgezogen und unter Epifluoreszenz (Kap.: 2.2.7) mikroskopiert (Unger et al., 2007; Hood and Shew, 1996) (modifiziert S. Fröbel). Die Mikroskopie fand zu verschiedenen Zeitpunkten (6 hpi, 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi, 4 dpi, 7 dpi) statt.

2.2.5 Calcofluor White Färbung

Die inokulierten Blattscheiben wurden auf einem Objektträger positioniert. Anschließend wurden 10 μ l 10 %ige KOH und 10 μ l Calcofluor White Lösung nacheinander aufgetropft. Um das Farbgemisch homogen auf der Probe zu verteilen, wurde ein Deckglas aufgelegt. Nach einer Inkubation von zwei bis drei Minuten wurde mit deionisiertem Wasser gespült. Danach wurden die Proben mit dem Epifluoreszenz-Mikroskop (Kap.: 2.2.7) mikroskopiert (Anregung λ 395 bis 440 nm, Emissionsfilter λ 470 nm) (Hageage and Harrington, 2016; Monheit et al., 1984).

2.2.6 4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) Färbung

Diese Färbung wurde zum Nachweis der Superoxide genutzt. Das Prinzip basiert auf der Reaktion des NBT-Farbstoffes mit Superoxidradikalen. Dabei wird ein unlöslicher, blauer Formazan-Farbstoff reduziert. Dieser ist im Pflanzengewebe mikroskopisch nachweisbar (braunes Gewebe). Für die Farblösung wurden zunächst 50 mM Natriumphosphat (pH 7,5) hergestellt und eine 0,2 % NBT-Farblösung hergestellt. Diese Lösung muss vor jedem Färbeansatz frisch hergestellt werden. Für den Nachweis der Superoxide wurden Blattscheiben zu verschiedenen Zeitpunkten (24 hpi, 48 hpi, 72 hpi) und von verschiedenen Genotypen gewählt. Sie wurden mit der NBT-Färbelösung über Nacht bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Am Folgetag wurden die Blattscheiben dreimal mit Wasser gespült und im Anschluss das Chlorophyll entfernt. Dabei wurden sie für 10 Minuten in absolutem Ethanol im Wasserbad gekocht. Die mikroskopische Beurteilung erfolgte mittels Auflicht (Kumar et al., 2013).

2.2.7 Mikroskopie

Für die mikroskopischen Analysen wurden die gleichen Genotypen verwendet, wie für die Stilben-Analyse (Tab.: 2.10 Genotypen). Dabei wurden Blattscheiben (Kap.: 2.2.2) für die Inokulation

vorbereitet und inokuliert. Nach der Inokulation wurden zu verschiedenen Zeitpunkten die Proben entnommen. Zum einen wurden die Zeitpunkte, zu denen die Stilben-Analyse stattgefunden hat (24 hpi, 48 hpi, 72 hpi), auch mikroskopisch untersucht und zum anderen wurden weitere Zeitpunkte, die Aufschluss über den *Rpv10*-kodierte Resistenzmechanismus geben sollen, angefügt. Dabei handelt es sich um 6 hpi, 4 dpi und 7 dpi. Zu den genannten Zeitpunkten wurde eine Anilin-Blau Färbung durchgeführt (siehe Kap. 2.12). Die Mikroskopie erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (Anregung λ 395 bis 440 nm, Emissionsfilter λ 470 nm).

2.2.8 Analyse von Winterknospen

Für die Bewertung von pathogenspezifischen Elementen in Winterknospen (Abb.: 2.5) wurden in zwei aufeinander folgenden Jahren, in den Monaten von Januar bis März jeweils 12 Knospen aus dem Freiland pro Monat und Genotyp untersucht. Unter den untersuchten Genotypen befanden sich 'Solaris' (*Rpv10/Rpv3.3*), 'Rondo' (*Rpv10*), 'Pinot blanc' (anfällig), 'Müller-Thurgau' (anfällig), und 'Gutedel' (anfällig).

Die Knospen wurden von den Stöcken mit einer Rasierklinge entfernt und in einem Probengefäß separiert. Vor der Separierung der Knospenschuppen wurden die Knospen halbiert und eine Hälfte bei -70°C gelagert. An der anderen Hälfte der Knospe wurden die einzelnen Knospenschuppen mit einer feinen Pinzette entfernt und von vorhandener Wolle befreit. Die Knospenschuppen wurden anschließend über Nacht in 1 N KOH bei 65°C inkubiert. Am Folgetag erfolgte eine Anilin-Blau-Färbung (Kap.: 2.2.4). Im Anschluss an die Färbung erfolgte die mikroskopische Beurteilung am Epifluoreszenzmikroskop.

Aus der gefrorenen Knospenhälfte wurde DNA extrahiert (Kap.: 2.2.9). Dazu wurden die Knospen mit flüssigem Stickstoff gekühlt und im Anschluss mit einem Pistill zerrieben. Aus der zermahlene Probe wurde die DNA unter Verwendung des Plant-Extraktions Kits (Tab.: 2.1.3), extrahiert.



Abbildung 2.5: Knospe von 'Solaris' am 5. März 2018. Eine vollkommen geschlossene Knospe aus der Freilandpflanzung. Diese wurde anschließend mit einer Rasierklinge so nah wie möglich am Holz entfernt und im Probengefäß separiert.

2.2.9 Extraktion von Nukleinsäuren

Präparation der BAC-Klone aus *E. coli* nach Birnboim and Doly (1979)

Die BAC-Klone (aus Dauerkulturen bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurden auf LB-Medium (Cm $12,5\text{ mg/ml}$) ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Von einer Kolonie wurde in 5 ml LB-Flüssig-Medium (Cm $12,5\text{ mg/ml}$) eine Über-Nacht-Kultur angelegt. Am Folgetag wurden zwei mal 2 ml der Über-Nacht-Kultur bei $9\ 000\text{ g}$ für zwei Minuten sedimentiert.

Das Zellpellet wurde mit $100\ \mu\text{l}$ Lösung I (Tab.: 2.17) vollständig resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten auf Eis wurden $200\ \mu\text{l}$ der Lösung II (Tab.: 2.18) zugegeben und der Reaktionsansatz vier mal zum Mischen invertiert. Nach dem Invertieren wurden die Ansätze für fünf Minuten auf Eis gehalten. In der Zeit wurde die Lösung III auf Eis vorgekühlt. Nach der Inkubationszeit wurden $200\ \mu\text{l}$ der Lösung III zugegeben und erneut vier mal invertiert. Nach einer fünf minütigen Inkubation auf Eis wurden die Ansätze für 15 Minuten bei $12\ 000\text{ g}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß dekantiert. Anschließend wurden $0,5\text{ ml}$ Isopropanol zum Überstand gegeben und nachfolgend für drei Sekunden mit Hilfe eines Vortexers gemischt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend erneut für fünf Minuten auf Eis gekühlt.

Nach fünf Minuten wurde der Ansatz $12\ 000\text{ g}$ für fünf Minuten zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde der Überstand vollständig verworfen. Das Pellet wurde in $200\ \mu\text{l}$ Lösung IV (Tab.: 2.19) mit 100 mg/ml RNase (Tab.: 2.20) gelöst. Danach wurden $10\ \mu\text{l}$ des Extraktes auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Der Ladebuffer wurde dabei mit 1% SDS versetzt, um einem Gel-Shift der BACs durch noch vorhandene verunreinigende Proteine vorzubeugen.

Extraktion von gDNA aus *P. viticola* Sporangien

Aus *P. viticola* Sporangien wurde gDNA nach dem Protokoll von Pintye et al. (2012) isoliert. Dabei wurden jedoch verschiedene Änderungen vorgenommen. Gefrorene Sporangien wurden mit einem konischen Stößel in 150 μ l Extraktionspuffer zerrieben. Das Sporen-Extraktionspuffer-Gemisch wurde anschließend für zehn Minuten bei -20°C gekühlt und im Anschluss bei 70°C für abermals zehn Minuten inkubiert. Nach einem fünf minütigen Abkühlen wurde für zehn Minuten bei 12 000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Alle nachfolgenden Extraktionsschritte erfolgten nach dem gegebenen Protokoll. Zum Schluss wurde in 50 μ l TE-Puffer eluiert.

Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *A. tumefaciens*

Die Bakterien-Kulturen (*E. coli* oder *A. tumefaciens*) wurden über Nacht in fünf Milliliter LB-flüssig-Medium (je nach Stamm mit entsprechenden Antibiotika) bei entsprechender Temperatur (*E. coli* 37°C bzw. *A. tumefaciens* 28°C) inkubiert. Am Folgetag wurden, nach dem Mischen, zwei mal 2 ml der Bakterienkultur je Probe in ein jeweils 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach den ersten zwei Millilitern wurde im Anschluss für zwei Minuten und 12 000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Auf das erste Pellet wurden erneut zwei Milliliter gegeben. Es folgte erneut ein Zentrifugationsschritt nachdem der Überstand wieder verworfen wurde. Die anschließende Plasmid-Präparation erfolgte nach Protokoll des Kit Herstellers (Tab.: 2.3 - Plasmidpräparation). Zum Schluss wurde zweimal in 30 μ l eluiert.

Extraktion von gDNA aus Blattmaterial

Für die Extraktion der gDNA der verschiedenen Sorten wurde das peqGOLD Plant DNA Mini Kit (siehe Tab.: 2.3) verwendet. Dafür wurden Blattscheiben (Durchmesser 1 cm) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend mit Mörser und Pestill feingerieben. Die nachfolgende Extraktion erfolgte nach Protokoll des Kit Herstellers.

Extraktion von Gesamt-RNA aus Blattmaterial

Für die Extraktion der Gesamt-RNA wurde Blattmaterial (ca. 1 cm²) verwendet. Zu den in flüssigem Stickstoff gefrorenen Proben wurden zwei Stahlkugeln (Durchmesser 4 mm) und eine Spatelspitze PVP zugegeben. Die Proben wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zwei mal für 30 Sekunden bei 30 Hz zerkleinert.

Im Anschluss wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Tab.: 2.3) nach Protokoll der Hersteller extrahiert. Für die anderen Methoden wurde das Protokoll verändert. Es wurde zusätzlich ein „On Column“ DNase I Abbau durchgeführt. Dazu wurden 2,5 µl DNase, 10 µl RDD Puffer und 87,5 µl nukleasefreies Wasser pro Probe gemischt und anschließend auf jede Probe 100 µl übertragen. Nach einer Inkubation von 15 Minuten wurden die Proben eine Minute bei 14000 g zentrifugiert. Die weiteren Schritte erfolgten nach Protokoll. Eluiert wurde zweimal in 35 µl Elution Puffer. Die Konzentration der RNA wurde im Anschluss photometrisch (λ 260 nm) bestimmt.

2.2.10 Decapping von mRNAs

Bevor eine Ligation durch die T4-RNA-Ligase am 5'-Ende der mRNA (aus drei verschiedenen Rebstöcken von 'Solaris') erfolgen kann, muss zunächst die Cap-Struktur der mRNA entfernt werden. Dafür stehen verschiedene Enzyme zur Verfügung, die das 7'-Methylguanosin entfernen und gleichzeitig ein freies Phosphat am Guanosin zurücklassen. Dieses Phosphat fungiert bei der Ligation als Linker (Coller and Parker, 2004).

Für das Decapping der mRNA wurde das Enzym RNA 5'-Pyrophosphohydrolase (RppH) verwendet. Dabei handelt es sich um ein bakterielles Enzym aus *E. coli*, welches freie Pyrophosphate am 5'-Ende der RNA entfernt. Zurück bleibt ein Monophosphat. Durch die Kombination mit dem Reaktionspuffer Thermopol ist das Enzym RppH in der Lage, das gewünschte 7'Methylguanosin von der mRNA zu entfernen (Deana et al., 2008; Richards et al., 2011). Es wurde ein Reaktionsansatz (Tab.: 2.22) mit 50 µl hergestellt, welcher im Anschluss für zwei Stunden im Wasserbad (37°C) inkubiert wurde. Nach der Inkubation wurde der Reaktionsansatz mit der RNA über das RNeasy® MinElute® Kit (Tab.: 2.1.3) aufgereinigt und in 12 µl eluiert.

Tabelle 2.22: Reaktionsansatz für das Decapping der mRNA.

Reagenz	Menge [µl]
RNA (1 µg)	x
10 x Thermopol Puffer	5
RppH (5 U/µl)	5
Ribolock (40 U/µl)	1
nukleasefreies Wasser	ad 50

2.2.11 RNA-Ligation

Für die Analysen des 5'-Endes nach dem Decapping und der Aufreinigung der RNA, erfolgte die Ligation mithilfe der T4-RNA-Ligase. Der Ligationsansatz (Tab.: 2.23) wurde über Nacht bei

16°C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurde der Ligationsansatz mit der ligierten RNA erneut mit dem RNeasy® MinElute® Kit (Tab.: 2.1.3) aufgereinigt und in 12 µl Elutionspuffer eluiert. Die Lagerung der ligierten RNA erfolgte bei -20°C.

Tabelle 2.23: Reaktionsansatz für die Ligation der RNA durch T4-RNA-Ligase.

Reagenz	Menge [µl]
RNA (1 µg)	12
DMSO	3
BSA (1 µg/µl)	3
Ribolock (40 U/µl)	1
T4-RNA-Ligase (10 U/µl)	1

2.2.12 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden 5 ng RNA (für qRT-PCR) in einem zweimal 20 µl-Ansatz erstellt und anschließend miteinander vermischt (Tab.: 2.25). Dafür wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems (Tab.: 2.3) verwendet. In der Methode wurde das Protokoll von Applied Biosystems sowohl im Reaktions-Ansatz als auch in der PCR verwendet. Das Programm für die Synthese ist in Tab.: 2.24 dargestellt.

Tabelle 2.24: Cyclor-Programm für die cDNA-Synthese.

Temperatur [°C]	Zykluszeit [min]
25	10
37	120
85	5
4	∞

Tabelle 2.25: 20 µl Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese.

Reagenz	Menge [µl]
Ansatz 1	
Reverse Transkriptase (RT, 50 U/L)	1
10 x RT-Puffer	2
25 x dNTPs (100 mM)	0,8
10 x RT-Random Primer	2
nukleasefreies Wasser	ad 10
Ansatz 2	
RNA (5 ng, 500 ng, 700 ng)	x
nukleasasefreies Wasser	ad 10

cDNA Synthese der 3'-RACE

Für die cDNA-Synthese wurden 700 ng RNA aus 5 verschiedenen Stöcken von 'Solaris' (jeweils im Doppelversuch) eingesetzt. Anstatt der Randomprimer wurde ein Poly-Oligo-(dT) (100 µM) eingesetzt, welches komplementär zum Poly-(A)-Schwanz der mRNA bindet. Am 5'-Ende des

Oligonukleotids befindet sich eine spezifische Nukleotidsequenz. Diese dient nach der cDNA-Synthese für die Amplifikation des gesamten 3'-Endes des Gentranskriptes. Im Weiteren wurde das Protokoll des Herstellers (Tab.: 2.3) beibehalten (cDNA-Synthese siehe 2.2.12).

cDNA Synthese der CR-RT-PCR und 5'-RACE

Für die cDNA-Synthese wurden 12 μl der ligierten RNA (Kap.: 2.2.10) eingesetzt. Der 50 μl -Ansatz erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (Tab.: 2.26, Kap.: 2.25).

Tabelle 2.26: 50 μl Reaktionsansatz der cDNA-Synthese bei der CR-RT-PCR und der 5'-RACE.

Reagenz	Menge [μl]
Reverse Transkriptase (RT, 50 U/L)	2,5
10 x RT-Puffer	5
25 x dNTPs (100 mM)	2
10 x RT-Random Primer	5
ligierte RNA	12
nuklesasefreies Wasser	ad 23,5

2.2.13 Amplifikation der Kandidatengene

Die Kandidatengene des *Rpv10*-Lokus wurden mit ihrem endogenen Promotor aus den BAC-Klonen (Tab.: 2.9) amplifiziert (Primersequenzen siehe Anhang A.3). Um die Eigenschaften zwischen dem anfälligen und resistenten Haplotypen gegenüberstellen zu können, wurden dementsprechend die BAC-Klone mit dem anfälligen und resistenten *Rpv10*-Haplotyp verwendet. Für die Amplifikation wurde eine 3-Step-PCR (Tab.: 2.28) mit der Phusion™ Polymerase (Reaktionsansatz Tab.: 2.27) durchgeführt. Die spezifischen Banden wurden pro Amplifikat mit einem Skalpell aus einem 1 % Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (Tab.: 2.3 PCR-Clean up).

Tabelle 2.27: 20 μl Reaktionsansatz zur Amplifikation der Kandidatengene.

Komponente	Probe [μl]	Negativkontrolle [μl]
5x Phusion HF Puffer	4	4
Template DNA	100 ng/ μl	-
10 μM Forward Primer	0,8	0,8
10 μM Reverse Primer	0,8	0,8
10 mM dNTPs	0,4	0,4
Wasser	ad to 20	ad to 20
0,02 U/ μl Phusion DNA Polymerase	0,2	0,2

Tabelle 2.28: Cycler-Programm zur Amplifikation der Kandidatengene.

Amplifikat	Länge [bp]	Zyklen	ini. Denaturierung		Denaturierung		Annealing		Elongation		fin. Elongation	
			T[°C]	t[sec]	T[°C]	t[sec]	T[°C]	t[sec]	T[°C]	t[min]	T[°C]	t[min]
<i>gRpv10#2^s</i>	2477						59,2			1		
<i>gRpv10#2^r</i>	2743	35	98	30	98	10	64,4	10	72	1,5		72
<i>gRpv10#1^s</i>	5095						65,8			2		
<i>gRpv10#1^r</i>	4862						65,4			2,5		

2.2.14 Klonierung der Kandidatengene - In-Fusion[®] HD Cloning

Die Primer für die Amplifikation der Kandidatengene wurden für das In-Fusion[®] HD Cloning so entworfen, dass sich die Überhänge in den linearisierten Vektor pLH9070 durch homologe Rekombination einbringen lassen. Die Linearisierung erfolgte durch die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *HindIII*. Es kann nur vermutet werden, dass es sich bei dem im Verfahren verwendeten Enzym um die Vaccinia Virus DNA Polymerase (3'-5' Exonuklease-Aktivität) handelt (Gammon and Evans, 2009). Der Hersteller gibt keine genaueren Spezifikationen.

Für die Klonierung wurde das In-Fusion[®] HD Cloning Kit verwendet (Tab.: 2.3). Die Klonierung erfolgte nach Protokoll.

Tabelle 2.29: 10 μ l Reaktionsansatz für das In-Fusion[®] HD Cloning.

Komponente	Probe [μ l]	Positivkontrolle [μ l]
5x In-Fusion HD Enzym Premix	2	2
PCR-Fragment (10-200 ng)	100 ng/ μ l	2 (Kontrollinsert 40 ng/ μ l)
linearisierter Vektor (50-200 ng)	2 (pLH9070 50 ng/ μ l)	1 (pUC19 Kontrollvektor 50 ng/ μ l)
Deionisiertes Wasser	ad to 10	ad to 10

2.2.15 3'-RACE-PCR

Für das Kandidatengen *Rpv10#1* wurde eine 3'-RACE am 3'-Ende des Gentranskriptes durchgeführt. Dabei wurde die cDNA mittels eines Oligonukleotids mit einem Poly-(dT) synthetisiert. An dessen Ende befand sich ein Sequenzabschnitt, welcher für die Amplifikation mittels eines Linker-Primers diente. Mittels eines genspezifischen Olinukleotids (Tab.: A.3), konnte im Anschluss an die cDNA-Synthese die Amplifikation des 3'-Endes erfolgen (PCR-Ansatz analog Tab.: 2.27). Das PCR-Programm für die Amplifikation des 3'-Endes ist in Tab.: 2.30 beschrieben.

Tabelle 2.30: Cycler-Programm für die 3'-RACE.

Amplifikat	Zyklen	ini. Denaturierung		Denaturierung		Annealing		Elongation		fin. Elongation	
		T[°C]	t[sec]	T[°C]	t[sec]	T[°C]	t[sec]	T[°C]	t[min]	T[°C]	t[min]
Gentranskript 3'-Ende	35	98	30	98	10	65	10	72	1	72	7

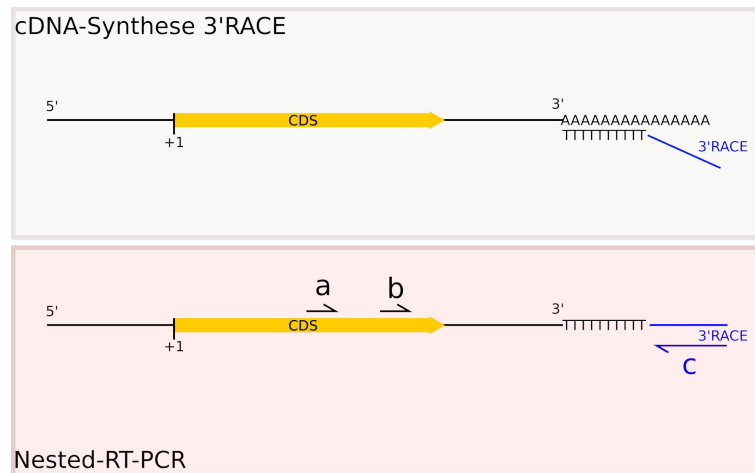


Abbildung 2.6: Prinzip 3'-RACE. Bei der cDNA-Synthese wird anstelle der Randomprimer ein Oligonukleotid mit einem Poly-(dT) und einer spezifischen Nukleotidsequenz am 5'-Ende komplementär zum Poly-(A)-Tail der mRNA eingebracht. Im Anschluss an die Synthese kann eine Amplifikation des gesamten 3'-Endes des Gentranskriptes über die spezifische Nukleotidsequenz des Oligonukleotids erfolgen. Auf den ersten PCR-Ansatz folgte eine nested-PCR. (a) - genspezifisches Oligonukleotid, (b) - genspezifisches Oligonukleotid für Nested PCR, (c) - Linker-Primer.

2.2.16 5'-RACE-PCR

Die CR-RT-PCR und 5'-RACE wurden ebenfalls für das Kandidatengen *Rpv10#1* durchgeführt. Für die Methode wurde die hohe Menge der 18 S rRNA in der RNA-Präparation genutzt, um diese an das 5'-Ende des Gentranskriptes zu ligieren. Dieses so entstandene „neue“ Transkript wurde mithilfe von „Random Hexamer“ Oligonukleotiden in cDNA übersetzt. Die cDNA wurde im Anschluß für die Amplifikation des 5'-Endes verwendet. Dabei wurde ein genspezifischer Primer und ein 18S rRNAf-Primer eingesetzt.

Tabelle 2.31: Cycler-Programm für die 5'-RACE.

Amplifikat	Zyklen	ini. Denaturierung		Denaturierung		Annealing		Elongation		fin. Elongation	
		T[°C]	t[sec]	T[°C]	t[sec]	T[°C]	t[sec]	T[°C]	t[min]	T[°C]	t[min]
Gentranskript 5'-Ende	35	98	30	98	10	61,8	10	72	1	72	7

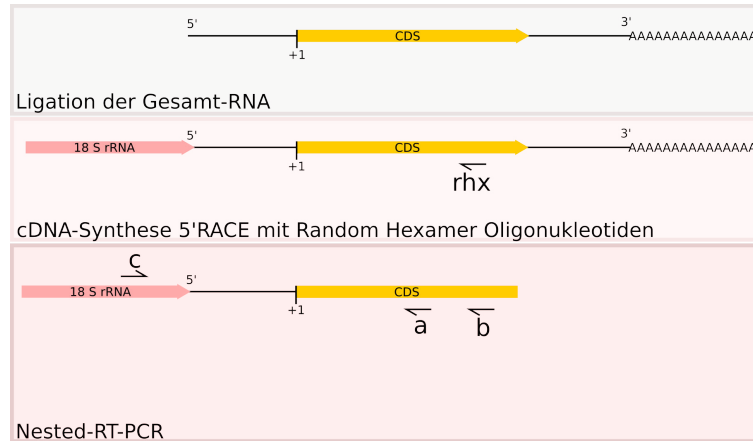


Abbildung 2.7: Prinzip 5'-RACE. Nach dem Decapping, der RNA-Ligation mit Hilfe der T4 RNA-Ligase und der cDNA-Synthese mittels Random Hexamer Oligonukleotiden, kann für die Amplifikation des Gentranskriptes am 5'-Ende ein spezifisches 18S rRNA-Oligonukleotid und ein genspezifisches Oligonukleotid eingesetzt werden. Auf den ersten PCR-Ansatz folgt eine nested-PCR. (a) - Oligonukleotid für Nested-PCR, (b) - genspezifisches Oligonukleotid, (c) - 18S rRNA-Oligonukleotid, rhx - Random Hexamer Oligonukleotid.

2.2.17 Circularized Reverse Transcription PCR (CR-RT-PCR)

Für die gleichzeitige Untersuchung des 3'- und 5'-Endes wurde eine CR-RT-PCR durchgeführt (Kuhn and Binder, 2002). Bei dieser Methode wird das 3'-Ende einer RNA mit dem 5'-Ende selbiger RNA ligiert. Nach der RNA-Ligation erfolgt die cDNA-Synthese. Diese cDNA wird im Anschluss für die RT-PCR genutzt. Für die Amplifikation wird jeweils ein Oligonukleotid am 5'-Ende und eines am 3'-Ende eingesetzt.

2.2.18 RNA-Seq-Analyse

Die experimentellen Vorarbeiten für RNA-Seq-Analysen wurden im April 2014 von Jens Dudenhöffer durchgeführt. Dafür wurden Proben von drei verschiedenen Genotypen jeweils vor, sowie sechs Stunden nach der Inokulation mit einer Sporangiensuspension (40 000 Sporangiosporen / Milliliter) entnommen. Insgesamt gab es für jeden Genotyp drei biologische Replikate.

Bei den Genotypen handelte es sich um 2008-059-020 (weder Träger von *Rpv3* als auch *Rpv10*), 2008-059-121 (Träger von *Rpv3* und *Rpv10*) und 2011-003-013 (Selbstung von 'Solaris', homozygot *Rpv10*). 2008-059-02 als auch 2008-059-121 stammen aus der Kreuzungspopulation von Gf.Ga-52-42 x 'Solaris'.

Die Auswertung und Verarbeitung der RNA-Sequenz-Rohdaten aller 18 Proben (zwei Zeitpunkte (0 hpi und 6 hpi), drei Genotypen mit jeweils drei biologischen Replikaten), wurden im Anschluss am JKI Siebeldingen Geilweilerhof mit der CLC Genomics Workbench 6.5.1. im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Die Qualität der Rohdaten wurde zunächst über FastQC überprüft. Danach erfolgte der Import der Rohdaten in die CLC Genomics Workbench, wo als erstes ein Qualitätstrimming mit

der TruSeq-Adapter-Sequenzliste durchgeführt wurde (NGS Core Tools, Trim Sequences, Quality Score 0,05, Max Ambiguous nucleotides 2). Dabei wurden die Adapter-Sequenzen aus den Reads entfernt. Anschließend wurden die Reads mit dem *P. viticola*-Genom (Yin et al., 2017) abgeglichen (NGS Core Tools, Map Reads to Reference, Mismatch cost 2, Insertion cost 2, Deletion cost 3, Length fraction 0,5, Similarity fraction 0,95). Bei diesem Schritt wurden die von *P. viticola* stammenden Teilsequenzen aus den Reads entfernt. Nach diesen, für die Auswertung wichtigen Vorbereitungsschritten, wurde die RNA-Seq-Analyse durchgeführt (Transcriptomics Analysis, RNA-Seq Analysis). Hierbei wurden die vorbereiteten Reads gegen das Referenzgenom von *V. vinifera* (Canaguier et al., 2017) gemapped (Minimum length fraction 0,9, Minimum similarity fraction 0,95, Maximum number of hits for a read 10, Eukaryote, Required relative expression level 0,2, Minimum number of reads 10, Minimum length 50, Expression value Genes RPKM). Die verschiedenen Zeitpunkte (0 hpi und 6 hpi) eines Genotypes wurden zu den biologischen Wiederholungen zugeordnet (Transcriptomics Analysis, Set Up Experiment, Two-group comparison, Paired). Anschließend wurde ein Test durchgeführt, der zu Auffindung differentiell exprimierter Gene dient (On Proportion, Baggerley's test (Baggerly et al., 2003), FDR corrected).

2.2.19 Der *Rpv10*-Lokus und seine Gene in der RNA-Seq-Analyse

„Large gap read mapping“ im *Rpv10*-Lokus und „Transcript discovery“

Das „Large gap read mapping“ dient der Erkennung von Gentranskripten unter Zuhilfenahme von RNA-Seq-Daten. Mit einer nachfolgenden „Transcript discovery“ lässt sich eine Voraussage zu einem möglichen Gentranskript machen.

In der CLC Genomics Workbench werden zunächst unter dem Punkt Transcriptomic Analysis → RNA-Seq Analysis → Large Gap Read Mapping die getrimmten Sequenzdaten vom jeweiligen Genotypen (2011-003-013 (*Rpv10/Rpv10*) und 2008-059-020 (*Rpv-/Rpv-*)) und der jeweiligen Zeitpunkte (0 hpi und 6 hpi) einzeln und für sich ausgewählt. Diese werden innerhalb des Tools einmal pro Zeitpunkt gegen die entsprechende Referenzsequenz des *Rpv10*-Lokus gemapped. Das heißt, die „Reads“ des homozygoten Genotypen (2011-003-013) werden jeweils von 0 hpi und 6 hpi gegen die Sequenz des sequenzierten resistenten Haplotypen des *Rpv10*-Lokus angeordnet bzw. die „Reads“ aus dem anfälligen Genotypen zu beiden Zeitpunkten gegen die Sequenz des anfälligen Haplotypen. Im Anschluss erfolgte die „Transcript discovery“ um das Gentranskript vorherzusagen (Transcriptomic Analysis, RNA-Seq-Analyse, Transcript Discovery).

2.2.20 qRT-PCR

Validierung der RNA-Seq-Analysen

Die qRT-PCR wurde ergänzend zu den RNA-Seq-Analysen durchgeführt. Da die verwendeten Genotypen aus der Arbeit von Jens Dudenhöffer nicht mehr zur Verfügung standen, wurden drei ähnliche Genotypen verwendet. Darunter befanden sich die resistenten Sorten 'Solaris' und 'Sibera', die beide Träger des *Rpv3.3*- als auch des *Rpv10*-Lokus sind und 'Müller-Thurgau' als anfällige Sorte. Von jeder Sorte wurden vier Pflanzen eine Woche vor Testbeginn in einer Klimakammer adaptiert (Tag-Nacht-Rhythmus von 16 (80 % rF) und 8 (100 % rF) Stunden mit

24°C und 22°C). Das erste und zweite Blatt basiseptal der Triebspitze jeder Pflanze ergaben die Proben vor der Inokulation (0 hpi) mit einer *P. viticola*-Sporangiensuspension. Nach der ersten Probennahme wurden das dritte bis fünfte Blatt, von drei der vier Pflanzen, mit der Sporangiensuspension (30 000 Sporangien/ ml) an der Unterseite der Blätter eingesprüht. Die vierte Pflanze zu jeder Sorte wurde mit Wasser besprüht. Anschließend folgte eine Inkubation (6 hpi) von sechs Stunden bis zur nächsten Probennahme. Alle Proben wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach folgte eine RNA-Extraktion (siehe Abschnitt 2.2.9 Gesamt-RNA-Extraktion) und die cDNA-Synthese (siehe Abschnitt 2.2.4 cDNA-Synthese).

In Tabelle 2.32 ist der verwendete Master Mix aufgeführt und in Tabelle 2.33 das PCR-Programm am Real-Time Cycler. Nach dem Auftauen aller Komponenten auf Eis, wurden diese gut gemischt und erst im Anschluss miteinander vermischt.

Tabelle 2.32: Master Mix der qRT-PCR.

Master Mix Komponente	Menge [μ l]
2 x Power SYBR [®] MM	10
Oligonukleotid forward (10 μ M)	0,5
Oligonukleotid reverse (10 μ M)	0,5
nukleasefreies Wasser	7
cDNA	2

Tabelle 2.33: PCR-Programm zur qRT-PCR.

Temperatur [°C]	Dauer	Zyklenzahl
95	10 min	1
95	15 sec	40
60	60 sec	

Nach Durchlauf des PCR-Programms wurde eine Schmelzkurven-Analyse der amplifizierten Fragmente durchgeführt. Anhand der Schmelzkurve lässt sich eine spezifische Aussage dazu machen, ob eines oder mehrere PCR-Produkte amplifiziert wurden. Durch die 7500 Fast Software v2.3 wurde der Ct-Wert der untersuchten Gene bestimmt.

Mittels der Ct-Werte konnte die relative Expression der ausgewählten Gene mit Hilfe der $\Delta\Delta$ Ct-Methode (delta-delta) (Livak and Schmittgen, 2001) ermittelt werden. Die relative Genexpression wird als „Fold change“ ($FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$) angegeben. Für die Berechnung werden sowohl die Ct-Werte des untersuchten Gens (GOI), wie auch die Ct-Werte des Referenzgens (RG) benötigt (siehe Formel 2.1).

$$FC = 2^{-((MeanCt_{GOI} - MeanCt_{RG})_{ZP2} - (MeanCt_{GOI} - MeanCt_{RG})_{ZP1})} \quad (2.1)$$

Für die Genexpressionsstudien wurden verschiedene Gene ausgewählt. Dazu gehören *ABR1*, *sERF5*, *MYB4* und *WRKY75*, die Referenzgene *SAND* und *UBC*.

2.2.21 Stilben-Analyse

Für die Stilben-Analysen wurden sieben verschiedene Genotypen (siehe Tab.: 2.1.7) mit verschiedenen Resistenzloki verwendet. Insgesamt wurden pro Genotyp vier Pflanzen in die Analysen einbezogen. Diese wurden wöchentlich mit Netzschwefel gegen *Erysiphe necator* (Erreger des Echten Mehltaus) behandelt (Kreuter, 1990). Von drei der vier Pflanzen wurde jeweils das zweite, dritte und vierte Blatt basiseptal der Triebspitze entfernt (Vorbereitung der Blattscheiben

siehe 2.2.2 Blattscheibentest). Die vierte Pflanze wurde jeweils für die Negativ-Kontrolle (Wasser) benutzt. Die Probennahme erfolgte zu vier Zeitpunkten (0 hpi (ohne Inokulation), 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi). Drei Blattscheiben pro Pflanze (insgesamt drei Wiederholungen pro Genotyp) wurden zu den Zeitpunkten vom Agar entfernt und die inkokulierten Bereiche mit einem Puncher (Durchmesser: 3 mm) ausgestochen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Diese wurden mit einer Feinwaage ($>4,5$ mg je Probe) eingewogen und bei -72°C gefroren. Die Positiv-Kontrolle wurde zu jeder Versuchspflanze mitgeführt und zu Beginn für 20 Minuten mit UV-C-Strahlung ($\lambda = 254$ nm) behandelt. Sie wurde in einer separaten Probenschale unter gleichen Bedingungen wie die inkokulierten Proben inkubiert und 72 Stunden nach der Behandlung eingefroren. UV-C-Strahlung ist eine energiereiche Strahlung, die dazu führt, dass der Photosyntheseapparat ein Übermaß an Energie aufbauen muss. Das führt zu ultrastrukturellen Veränderungen der zellulären Bestandteile. Im schlechtesten Fall kann dies zu einer spontanen Reaktion führen, die Sauerstoffradikale bilden und weiterführend andere Stoffe oxidieren können. Dadurch kann es zum Zelltod des betroffenen Gewebes kommen wodurch ebenfalls Stilbene nachweisbar werden. Für die Extraktion wurden $50\ \mu\text{l}$ Methanol auf die Probe gegeben und das Reaktionsgemisch für 10 Minuten bei 60°C unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurde das Gemisch fünf Minuten im Eisbad abgekühlt und danach drei Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein HPLC-Vial (mit Inlet) überführt und die Proben anschließend mit dem Probenrack zur Analyse in die HPLC gestellt. Für die Messung der sechs Substanzen wurde die SIM-Methode (selected ion monitoring) verwendet. Die Messungen erfolgten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Analytik.

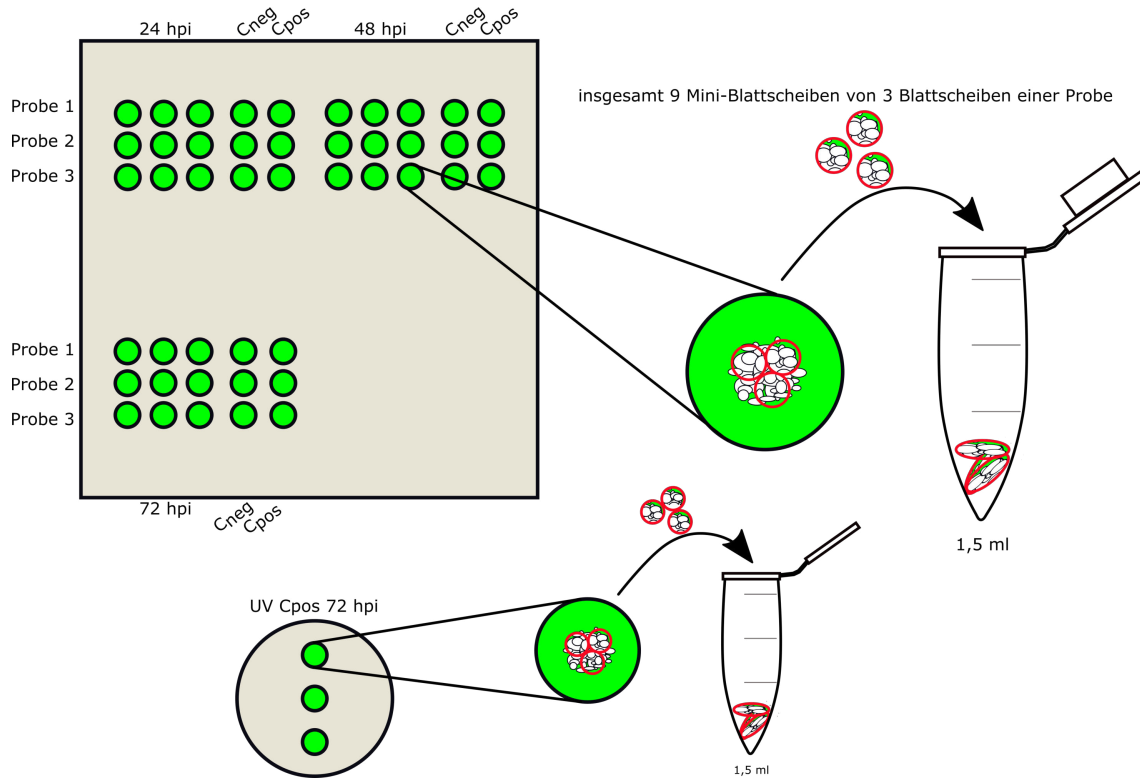


Abbildung 2.8: Probenzubereitung zur Stilben-Analyse. Der Blattscheibentest wurden auf 1 %-Agar aufgelegt und im Anschluss mit einer Sporangiensuspension inokuliert. Die Negativkontrolle wurde mit Wasser inokuliert und die Positivkontrolle wurde mitgeführt, um eine Aussage über eine erfolgreiche Infektion machen zu können. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden die Blattscheiben vom Agar entnommen, insgesamt neun kleine Blattscheiben (3 mm) ausgestochen, diese gewogen und bei -72°C bis zur Extraktion gelagert. Zu jedem Genotyp wurde eine UV-Positivkontrolle nach 72 hpi mitgeführt.

Die Probenzubereitung und Extraktion der Stilbene erfolgte nach Pezet et al. (2003). Modifiziert wurde die Methodik lediglich in einem Schritt nach der Inkubation auf Eis. Hier wurde ein Zentrifugationsschritt von drei Minuten bei 13000 rpm eingeschoben. Danach wurden $30\ \mu\text{l}$ des Überstandes in die HPLC-Vials mit Inlet überführt.

Die Detektion erfolgte mittels HPLC bei der die Trennung über einer Reversed Phase C18 - Säule stattfand. Die Messung der Stilbene erfolgte mittels DAD (diode-array detector) bei $\lambda = 307\ \text{nm}$ (DAD B). Als Eluenten wurden 0,1 % Methansäure in Wasser (Eluent A) und 0,1 % Methansäure in Acetonitril (Eluent B) verwendet. Die Flussrate in der Analyse betrug dabei 0,4 ml/min mit folgendem Gradienten (Tab.: 2.34).

Tabelle 2.34: Elutionsmittelgradient für die HPLC zur Identifikation der Stilbene.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
2	98	2
12	90	10
14	88	12
20	80	20
26	50	50
28	50	50
29	0	100
29,5	98	2
30	98	2

Um die interessierenden Substanzen zu identifizieren, wurden verschiedene Referenz-Standards für Stilbene mit analysiert. Bei den Standard-Substanzen handelt es sich um Astringin, Piceid, Piceatannol, Resveratrol, ϵ -Viniferin und Pterostilben.

2.2.22 Berechnung der Myzelfläche im Vergleich zwei und sieben Tage nach Inokulation

Für den Vergleich des infiltrierten Myzels zwischen den verschiedenen Genotypen (Tab.: 2.1.7) wurde die Fläche des infiltrierten Myzels zwei und sieben Tage nach der Inokulation über die Software WinRhizo („Color Analysis“) berechnet. Dafür wurden mikroskopische Aufnahmen mit gleicher Vergrößerung (100 fache) und Belichtungszeit (eine Minute, Helligkeit 100 %) verwendet. Der Maßstab (200 μm) für die Berechnung musste sowohl vertikal als auch horizontal angegeben werden. Pro Genotyp wurden drei biologische und zwei technische Wiederholungen aufgenommen und analysiert. Die Bilder wurden vor dem Import bearbeitet. Hierbei wurden Blattadern mit Fluoreszenz entfernt.

Als erstes wurde die Analysemethode „Color Analysis“ unter „Analysis/Root & Background Detection“ angegeben. Nach dem Import der mikroskopischen Bilder wurde zunächst die Maßeinheit an Hand des Maßstabes für die Berechnung der Fläche festgelegt. Anschließend wurden die Bereiche an Hand der Farbe markiert, die in die Berechnung einfließen (RGB-Code Background: 91 34 22 10 10 10, Myzelium: 113 119 45 10 10 10, Penetration site: 111 143 112 10 10 10). Es wurde hierbei zwischen Hintergrund (wird aus der Berechnung ausgeschlossen), intensivster (Penetration site) und schwächster (Myzelium) Fluoreszenz unterschieden. In die Berechnung der Fläche werden von der Software alle Bereiche aufgenommen, die sich zwischen den beiden gewählten Intensitätsstufen im Bildausschnitt befinden. Im Anschluss an diese Einstellungen wird der Bildausschnitt gewählt. Hierbei wurden sofern vorhanden, die Sporangioophoren und Sporangien ausgeschlossen, da durch reine „Farbwahl“ auf Grund der gleichen Fluoreszenz, kein Ausschluss dieser erfolgen konnte. Für alle berechneten mikroskopischen Aufnahmen wurden die gleichen Einstellungen verwendet.



Abbildung 2.9: „Color Analysis“ mit WinRhizo. Links befindet sich die mikroskopische Abbildung. Diese wird nach Entfernen der fluoreszierenden Blattadern importiert. Rechts befindet sich das berechnete Bild nach der Color Analyse mit WinRhizo.

2.2.23 Triparentales Mating

Während der Klonierung wurde der Vektor pLH9070 mit dem entsprechenden Insert (*Rpv10#2* bzw. *Rpv10#1*) in *E. coli* StellarTM Zellen vervielfältigt. Das Plasmid wurde anschließend isoliert (Tab.: 2.1.3 Plasmidpräparation) und über PCR und Sequenzierung das richtige Insert identifiziert.

Für das triparentale Mating werden drei verschiedene Ausgangsstämme verwendet, *A. tumefaciens* EHA101 oder EHA105, in welches das Insert in pLH9070 transferiert (rezipient strain) werden soll. *E. coli* HB101 pRK2013 besitzt das F-Plasmid (helper strain) und *E. coli* StellarTM enthält das rekombinante Plasmid mit Insert (donor strain) (Eigenschaften der Stämme siehe Tab.: 2.7 und 2.8). Diese werden zuerst auf den entsprechenden Selektivmedien (EHA101: Kan 50 µg/ml und Rif 100 µg/ml, EHA105: Rif 100 µg/ml, HB101 pRK2013: Kan 50 µg/ml, StellarTM: Spec 100 µg/ml) kultiviert. Von den drei Ausgangsstämmen wurde eine ausreichend große Menge der Kolonien mit einem sterilen Stäbchen abgenommen und auf LB-Medium miteinander vermischt. Anschließend werden sie zwei Tage bei 28°C inkubiert. Danach werden die am Rand liegenden Kolonien (Zuwachs) auf Selektivmedium (EHA101 mit rekombinaten Plasmid: Kan 50 µg/ml, Spec 100 µg/ml und Rif 100 µg/ml, EHA105: Spec 100 µg/ml und Rif 100 µg/ml) vereinzelt. Erfolgte eine Konjugation des rekombinanten Plasmides mit Insert nach *A. tumefaciens* EHA101 oder EHA105, werden Kolonien nach zwei Tagen und 28°C sichtbar (Schema zur Methodik siehe Abb.: 2.10) (Zyprian and Kado, 1990).

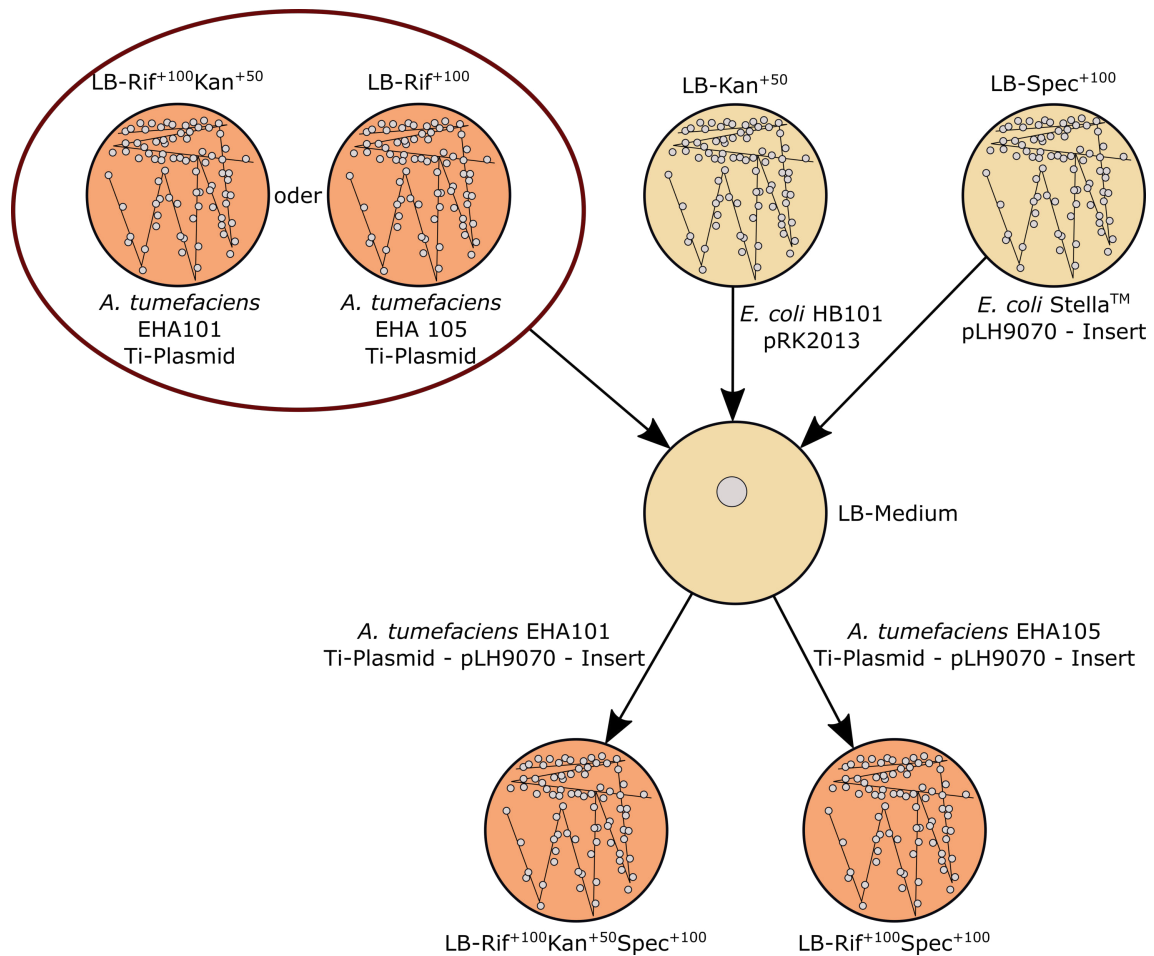


Abbildung 2.10: Schema des triparentalen Matings. Schematische Darstellung des triparentalen Matings mit den *Agrobacterium*-Stämmen EHA101 und EHA105, dem F-Plasmid-tragenden *E. coli* HB101 pRK2013 und den *E. coli* Stellar[™] mit dem gewünschten Insert in pLH9070.

Nach der Kultur auf Selektivmedium werden vereinzelte Kolonien zunächst auf einer neuen Selektiv-Platte ausgestrichen und eine Einzelkolonie in eine Selektivflüssigkultur eingerührt. Die Selektiv-Platte wird erneut bei 28°C für zwei Tage inkubiert. Die Flüssigkultur wird über Nacht bei ebenfalls 28°C auf dem Schüttelinkubator bei 200 rpm inkubiert. Am Folgetag erfolgt eine Plasmidpräparation. Mittels PCR kann das Vorhandensein des Inserts kontrolliert werden.

2.2.24 Transformation in Kalli verschiedener anfälliger *Vitis*-Genotypen

Für die Transformation der Konstrukte (Kandidatengen mit ihrem endogenen Promotor aus den resistenten Haplotypen) in anfällige Rebsorten ('Riesling' und 'Chardonnay') wurde zuvor embryonales Gewebe aus Antheren gewonnen. In die entstandenen, undifferenzierten, totipotenten Zellen (Kalli, siehe Abb.: 2.11) wurden die Konstrukte über *Agrobacterium tumefaciens*

(Stämmen EHA101 und EHA105), transformiert. Die Pflanzen-Transformation wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Harst der Arbeitsgruppe „*In vitro*“ durchgeführt.

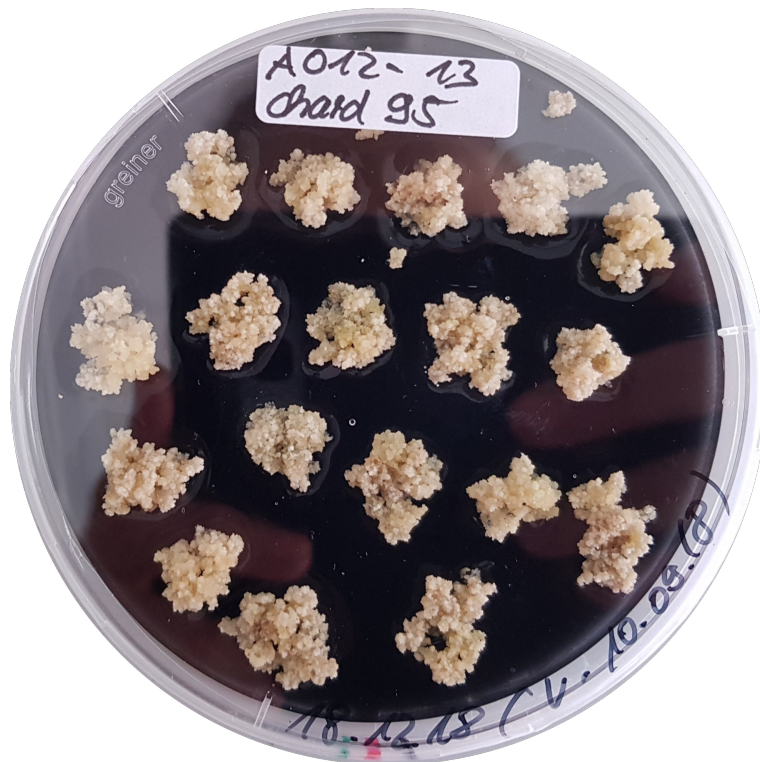


Abbildung 2.11: Anzucht embryonalen Gewebes am Beispiel von 'Chardonnay'. Im Bild ist embryonales Gewebe auf aktivkohlehaltigem Medium zu sehen. Die Aktivkohle fängt phenolische Abbauprodukte ab, damit für das embryonale Gewebe optimale Wachstumsbedingungen bestehen.

2.2.25 Selektion regenerierter Keimlinge

Die Selektion der regenerativen Keimlinge erfolgte durch eine Doppelselektion mit der Zugabe der Wirkstoffe Kanamycin ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) und Phosphinothricin ($7,5 \mu\text{g}/\text{ml}$) in das Vollmedium. Beide Selektionsmarker sollten bei erfolgreicher Insertion der T-DNA des pLH9070 Plasmids (Tab.: 2.1.5) in das Genom der Wirtspflanze integriert werden. Werden die transgenen Pflanzen in diesem Schritt mit Kanamycin behandelt, kommt es bei Abwesenheit der entsprechenden Gene (*nptII* (Neomycin-Phosphotransferase II) und *bar* (Phosphinothricin-N-Acetyltransferase)) zum Absterben der Chloroplasten, was im weiteren Verlauf zu Chlorosen führt. Im Anfangsstadium verfärben sich die Blätter nach hellgelb. Diese ersten Anzeichen werden durch eine stark verminderte Photosyntheseleistung bewirkt, die im weiteren Verlauf zu einem Absterben der gesamten Pflanze führt. Phosphinothricin, ein Herbizid, inhibiert die Glutaminsynthetase, wodurch die Photorespiration in der Pflanze gehemmt wird. Wird die Glutaminsynthetase inhibiert, kann weniger freies Ammoniak fixiert werden. Durch die ansteigende Ammoniak-Konzentration in den Zellen wird eine toxische Krise ausgelöst. Befindet sich jedoch, wie in den transgenen Pflanzen, das *bar*-Gen im Genom der Pflanzen, wird das aufgenommene Phosphinothricin acetyliert. Durch

diese Inaktivierung wird das Wachstum der transgenen Pflanze nicht beeinträchtigt. Deshalb wurden die Pflanzen, die ein normales Wachstum aufwiesen, auf Medium ohne Selektionszusätze umgesetzt. Nach entsprechendem Wachstum der Pflanzen wurde Blattmaterial entnommen, gDNA extrahiert (Kap.: 2.2.9) und mittels PCR das Vorhandensein des gewünschten Inserts geprüft.



Abbildung 2.12: Anzucht transgener Reben am Beispiel von 'Chardonnay'.

3 Ergebnisse

3.1 Bioinformatische Analyse der Kandidatengensequenzen

Der *Rpv10*-Lokus wurde von Schwander et al. (2012) mit einer Größe von 79 kb beschrieben (Schwander, 2012) und wird durch die Marker GF09-65 und GF09-47 begrenzt. Später wurde dieser durch BAC-Klone sequenziert (Dudenhöffer, 2016). Als Vektor wurde der pCUGIBAC1 (10.147 kb) (Luo et al., 2001) verwendet. Dieser wurde aus dem low copy BAC-Vektor pIndigo-Bac536 und dem high copy Vektor pGEM4Z ligiert. Sequenzen aus dem *Rpv10*-Lokus wurden hier mit einer Größe von 89 kb inseriert. Die Kandidatengene *Rpv10#1* und *Rpv10#2* wurden aus insgesamt sieben annotierten Genen des *Rpv10*-Lokus (LG9, 3624 kb - 3703 kb) ausgewählt. Die Wahl erfolgte durch den Vergleich der sieben Gene mit Genhomologen anderer Spezies. Der sequenzierte Bereich des resistenten Haplotypen des *Rpv10*-Lokus ist 83.66 kb und der des anfälligen Haplotypen beträgt 81.51 kb. Das Kandidatengen *Rpv10#1* (anfälliger Haplotyp 883 AS, resistenter Haplotyp 886 AS, Pos. 3682 kb Chr. 9) zeigt eine Homologie zu dem Resistenzgen *RPS5* aus *A. thaliana* und besitzt eine NB-ARC- (Pos. 159 - 431, 276 AS) sowie eine LRR-Domäne (Pos. 533 - 593, 61 AS). Die kodierende Proteinsequenz des anfälligen Haplotypen ist 883 und die des resistenten 886 Aminosäuren lang. Das zweite Kandidatengen *Rpv10#2* ist ein Homolog zum Gen für den Transkriptionsfaktor (TF) AP2/ERF (Pos. 3658 kb Chr. 9), ebenfalls aus *A. thaliana*. Das Protein besitzt eine AP2-Domäne (Pos. 63 - 119, 57 AS), die im resistenten Haplotypen 230 und im anfälligen 236 Aminosäuren lang ist. Diese beiden Kandidatengene wurden untersucht und in beiden Haplotypen charakterisiert.

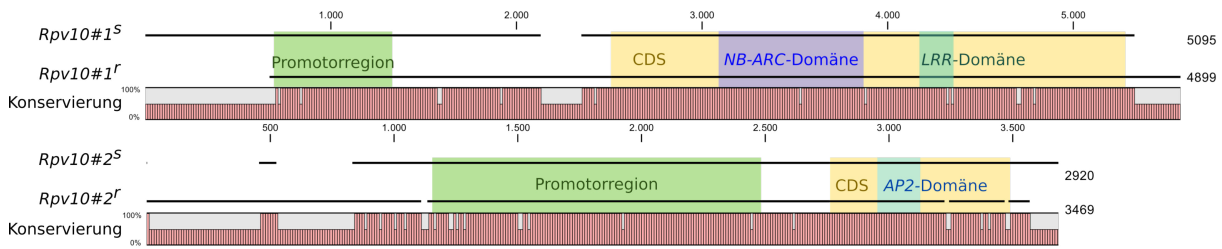


Abbildung 3.1: Überblick über die Kandidatengene mit ihren endogenen Promotoren auf DNA-Ebene. Zwei Alignments jeweils zwischen anfälligen und resistenten Haplotypen. Die untere Abbildung zeigt das Kandidatengen *Rpv10#2* mit CDS sowie zugehöriger AP2-Domäne und endogenem Promotor. Die obere Abbildung zeigt das Kandidatengen *Rpv10#1*, analog wie oben, mit CDS sowie den beiden kodierenden Domänen (NB-ARC und LRR) und die Promotorregion. Die roten Balken der Konservierung zeigen Stellen an, an denen sich die Sequenzen von einander unterscheiden, etwa durch SNP's oder Deletion/Insertion.

Zusätzlich zu den Sequenzinformationen konnten die „Reads“ aus den RNA-Seq-Analysen für ein „large gap read mapping“ genutzt werden. Damit erfolgte eine Vorhersage der tatsächlichen Transkripte und ihrer kodierenden Sequenz (CDS). Die Analyse („large gap read mapping“) wurde auf dem gesamten *Rpv10*-Lokus für den anfälligen sowie für den resistenten Haplotypen (und die Zeitpunkte 0 hpi und 6 hpi) durchgeführt und die Ergebnisse in den Abbildungen 3.2 und 3.3 gegen übergestellt.

Die vorhergesagte CDS des „large gap read mapping“ zeigt im Kandidatengen *Rpv10#1* eine deutliche Veränderung der CDS zwischen 0 und 6 hpi, aber auch von anfällig zu resistent. Während es bei diesem Kandidaten im anfälligen Haplotypen zu keiner Änderung der CDS nach Befall des Pathogens kommt, wird im resistenten Haplotypen die kodierende Sequenz vollkommen verändert. Hierbei kommt es zu einer „Verkürzung“ der CDS (6 hpi). Dabei bleibt nur noch ein Teil der kodierenden NB-ARC-Domäne erhalten. Die kodierende LRR-Domäne scheint nach der frühen Interaktion nicht mehr transkribiert zu werden (Abb. 3.3).

Für das Kandidatengen *Rpv10#2* kann im anfälligen Haplotypen eine CDS innerhalb des Gens vorhergesagt werden. Diese ist sechs Stunden nach der Inokulation nicht mehr in der kodierenden Sequenz vorhanden. Im resistenten Haplotypen kann zu beiden Zeitpunkten keine Vorhersage der möglichen CDS aus den Transkripten erfolgen (Abb. 3.2).

3.1.1 Kernimportsignale (NLS)

Die NLS wurden für die beiden Kandidatengene (*Rpv10#1* und *Rpv10#2*) und deren Haplotypen untersucht. Es konnte jeweils ein NLS in den beiden Haplotypen des Kandidatengens *Rpv10#2*, welches Homologien zu den Transkriptionsfaktor AP2/ERF ausweist, gefunden werden. Das NLS befindet sich innerhalb der Proteinsequenz unmittelbar vor der AP2-Domäne (Pos. 49 - 55, 7 AS). In beiden Haplotypen ist das Signal an gleicher Position mit gleicher Sequenzabfolge (PATKGR) positioniert und gehört zur NLS-Klasse 2.

Innerhalb des Kandidatengens *Rpv10#1* konnte kein NLS gefunden werden.

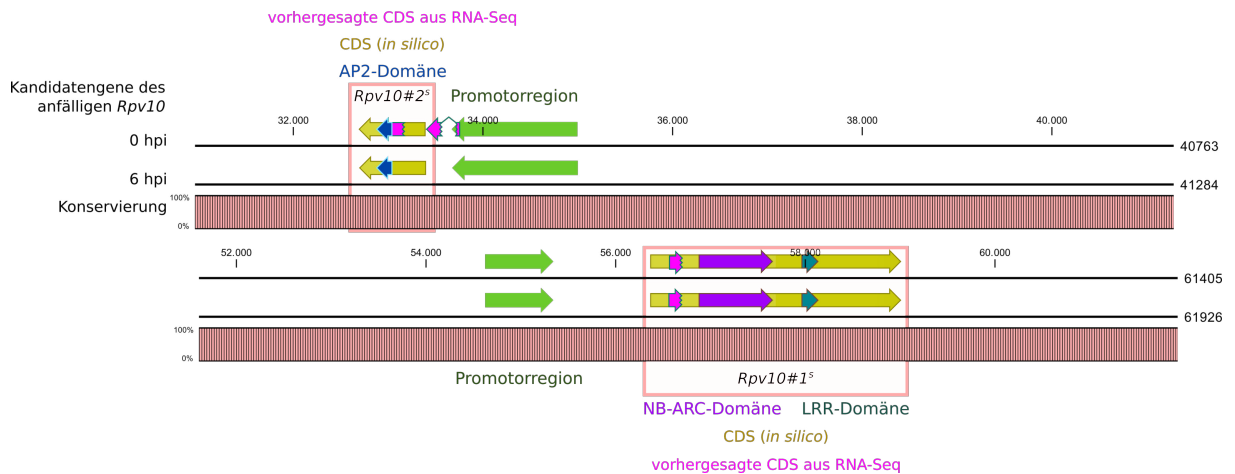


Abbildung 3.2: Ergebnisse des „Large Gap Read mapping“ (*Rpv10#1* (unten) und *Rpv10#2* (oben) auf DNA-Ebene) im anfälligen *Rpv10*-Lokus. Der anfällige Haplotyp des *Rpv10*-Lokus ist jeweils zum Zeitpunkt 0 hpi und 6 hpi miteinander im Vergleich abgebildet. Dabei wurde hier nur der Ausschnitt der beiden Kandidatengene betrachtet. Die Promotorregion ist in grün vor dem Gen dargestellt. Gelb sind die *in silico*-Vorhersagen der CDS, pink ist die Darstellung der durch die RNA-Seq-Analyse ermittelten CDS und die andersfarbigen Pfeile sind jeweils die kodierenden Domänen im jeweiligen Kandidatengen.

3.1.2 Nucleotide Binding Site (NBS) Motive

Die NBS-Motive (Kap.: 2.2.1) wurden ausschließlich im Kandidatengen *Rpv10#1* gesucht, da hier in beiden Haplotypen die NB-ARC-Domäne vorliegt. Von den fünf Motive in der Recherche wurden zwei Motive identifiziert. Diese sind in beiden Haplotypen an gleicher Position gleich und nicht durch SNP's verändert. Das Motiv NBS-I wurde an Position 178 - 185 gefunden (GGVGKTTL) und NBS-VI befindet sich an Position 342 - 348 (KGLPLAL). Für die beiden mittleren Klassen (NBS II und III) wurden keine Übereinstimmungen gefunden.

3.1.3 Leucine Rich Repeat (LRR) Motive

Wie die NBS-Motive wurden auch die LRR-Motive ausschließlich im Kandidatengen *Rpv10#1* gesucht, da hier die schon vorhergesagten Domänen die Suche nahe legen. Es wurde bei der Suche in drei verschiedene Motive unterschieden (Kap.: 2.2.1). Von diesen Motiven konnte das LRR-core-Motiv in beiden Haplotypen 17 mal gefunden werden (Tab.: 3.1). Dabei zeigt sich ein verstärktes Auftreten nach der NB-ARC-Domäne. Innerhalb dieses Bereiches konnte sowohl das LRR-core-extended-Motiv einmal gefunden werden, als auch zwei mal das RPS5-spezifische LRR-Motiv. Die Tabelle 3.1 zeigt alle gefundenen LRR-Motive in den kodierenden Sequenzen der beiden Haplotypen. In Motiven, die sich an gleicher Position befinden, jedoch durch SNP's von einander abweichen, wurden die sich unterscheidenden Aminosäuren in grün hervorgehoben. Dabei konnten insgesamt 17 SNPs in 20 gefundenen Motiven nachgewiesen werden.

Tabelle 3.1: LRR-Motive des kodierten Proteins aus dem Kandidatengen *Rpv10#1*.

LRR-Motiv	Position des Motivs	
	resistenter Haplotyp	anfälliger Haplotyp
LRR-core-Motiv VGLDLMF	151 - 157	-
LRR-core-Motiv MGLDLMF	-	151 - 157
LRR-core-Motiv DRLNLME	262 - 268	262 - 268
LRR-core-Motiv KGLPLAL	342 - 348	342 - 348
LRR-core-Motiv RSLKLAC	450 - 456	450 - 456
LRR-core-Motiv MALWLSC	476 - 482	476 - 482
LRR-core-Motiv EELSLSP	523 - 529	-
LRR-core-Motiv EGLSLSP	-	523 - 529
LRR-core-Motiv CFLNLRT	530 - 536	530 - 536
LRR-core-Motiv RVLDSLSS	559 - 565	-
LRR-core-Motiv RVLDSL SY	-	559 - 565
LRR-core-Motiv VELPLEI	570 - 576	570 - 576
LRR-core-Motiv EFLNLAW	583 - 589	-
LRR-core-Motiv EFLNLAR	-	583 - 589
LRR-core-Motiv RCLILDD	606 - 612	-
LRR-core-Motiv RCLILDN	-	606 - 612
LRR-core-Motiv TSLMLQK	680 - 686	680 - 686
LRR-core-Motiv ICLGLQV	695 - 701	-
LRR-core-Motiv VELPLSA	702 - 708	-
LRR-core-Motiv VELPLST	-	702 - 708
LRR-core-Motiv QFLDLTW	-	754 - 760
LRR-core-Motiv PSLELLW	765 - 771	-
LRR-core-Motiv PSLELLC	-	765 - 771
LRR-core-Motiv VKLWLHD	804 - 810	-
LRR-core-Motiv VVLWLRG	-	804 - 810
LRR-core-Motiv RKLPLNS	839 - 845	839 - 845
LRR-core-extended-Motiv LVKLWLHDL	803 - 811	-
LRR-core-extended-Motiv LVVLWLRGL	-	803 - 811
RPS5-spezifisches LRR-Motiv LRCLILDDIRKL	605 - 616	-
RPS5-spezifisches LRR-Motiv LRCLILDNIWKL	-	605 - 616
RPS5-spezifisches LRR-Motiv LVKLWLHDL PNL	803 - 814	-
RPS5-spezifisches LRR-Motiv LVVLWLRGL PNL	-	803 - 814

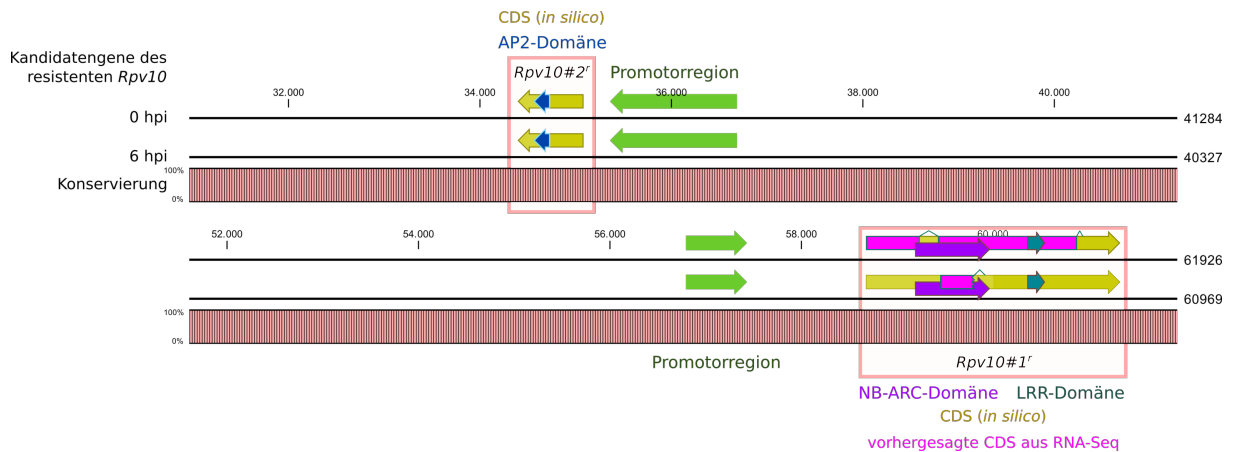


Abbildung 3.3: Ergebnisse des „Large Gap Read mapping“ (*Rpv10#1*(unten) und *Rpv10#2* (oben) auf DNA-Ebene) im resistenten *Rpv10*-Lokus. Der resistente Haplotyp des *Rpv10*-Lokus ist jeweils zum Zeitpunkt 0 hpi und 6 hpi mit einander im Vergleich abgebildet. Dabei wurde hier nur der Ausschnitt der beiden Kandidatengene betrachtet. Die Promotorregion ist in grün vor dem Gen dargestellt. Gelb sind die *in silico*-Vorhersagen der CDS, pink ist die Darstellung der durch die RNA-Seq-Analyse ermittelten CDS und die andersfarbigen Pfeile sind jeweils die kodierenden Domänen im jeweiligen Kandidatengen.

3.1.4 Motive von Peptidsegmenten in Nucleotide Binding Sites (NBS)

Die bioinformatischen Untersuchungen der Motive erfolgte an der kodierten Proteinsequenz des jeweiligen Kandidatengens. Dafür erfolgte vorab eine Translation aus den entsprechenden DNA-Regionen der Kandidatengene.

Im Kandidatengen *Rpv10#1* wurden in der kodierenden Sequenz des anfälligen Haplotypen acht Kinase-Motive vom Typ -1a, -2 und -3a und im resistenten sechs Kinase-Motive (Typ -1a, -2) gefunden (Tab.: 3.2). Innerhalb der Kinase-Motive gab es keine SNP's. 13 Motive vom Typ 2 der NMP-Motive konnten in beiden Haplotypen identifiziert werden (Tab.: 3.3). In einem der Motive, welches in beiden Haplotypen an gleicher Position gefunden wurde, kam es zu einem SNP (grün dargestellt, Tab.: 3.3).

Tabelle 3.2: Kinase-2 Motive des kodierten Proteins aus dem Kandidatengen *Rpv10#1*.

Kinase-Motiv	Position des Motivs		Domäne
	resistenter Haplotyp	anfälliger Haplotyp	
Kinase-1a GIGGVGKTT	176 - 184	176 - 184	NB-ARC
Kinase-2 NLSKD	44 - 48	-	
Kinase-2 KGHFD	127 - 131	127 - 131	
Kinase-2 TAPDD	-	226 - 230	NB-ARC
Kinase-2 VILLD	254 - 258	254 - 258	NB-ARC
Kinase-2 KFSYD	390 - 394	390 - 394	NB-ARC
Kinase-2 LILDD	608 - 612	-	
Kinase-2 NIEKD	-	639 - 643	
Kinase-3a AFSLFR	-	311 - 316	NB-ARC
Kinase-3a EFQGCY	-	716 - 721	

Tabelle 3.3: NMP-Motive des kodierten Proteins aus dem Kandidatengen *Rpv10#1*.

NMP2-Motiv	Position des Motivs		Domäne
	resistenter Haplotyp	anfälliger Haplotyp	
CLEDEQ	163 - 168	163 - 168	NB-ARC
QKINNE	187 - 192	187 - 192, 636 - 641	NB-ARC
VILLDD	254 - 259	254 - 259	NB-ARC
CLTRDE	305 - 310	305 - 310	NB-ARC
KIVVEE	335 - 340	335 - 340	NB-ARC
PQEWEQ	-	361 - 366	NB-ARC
SYDHLD	392 - 397	392 - 397	NB-ARC
VLDHGQ	-	493 - 498	
VQLIEA	497 - 502	-	
EFLNLA	583 - 588	583 - 588	LRR
CLILDD	607 - 612	-	
ELQELE	652 - 657	652 - 657	
EIIGSD	-	780 - 785	
ELLWIE	768 - 773	-	
SYVMEE	775 - 780	-	
ELEWED	864 - 869	-	
ELERED	-	864 - 869	

3.1.5 Vergleich des anfälligen und resistenten Haplotypen des Kandidatengens *Rpv10#1* - Unterschiede in der DNA-Sequenz zur Aminosäuresequenz

In der NB-ARC-Domäne (Tab.: 3.5) wurden zwischen den beiden Haplotypen 24 Mutationen gefunden. Bei sieben der Mutationen handelt es sich um eine silent-Mutation (blau). Die anderen 17 Mutationen führen zu einer missense-Mutation, von der es bei acht Mutationen (orange) zu

einer Änderung der Aminosäureeigenschaft kommt. Die übrigen neun missense-Mutationen verlaufen ohne Eigenschaftsänderung der kodierten Aminosäuresequenz (dunkel grün).

Für die Bestimmung der Mutationen in der LRR-Domäne wurde eine schematische Abbildung (Abb.: 3.4) angefertigt. Alle Mutationen wurden analog zur NB-ARC-Domäne in Tabelle 3.4 mit ihren Positionen aufgelistet. Insgesamt befinden sich sieben Mutationen innerhalb der LRR-Domäne. Davon bleiben zwei der Mutationen still (blau), zwei weitere gehen ohne Änderung der Aminosäureeigenschaft (dunkel grün) einher und bei den restlichen drei missense-Mutationen kommt es zur Änderung der Aminosäureeigenschaft der kodierten Aminosäuresequenz (orange).

Innerhalb des Kandidatengens *Rpv10#2* befindet sich eine silent-Mutation in der kodierten *AP2*-Domäne an Position 21 im Protein. Dabei handelt es sich um ein Alanin, welches jeweils an der letzten Stelle im Triplet verändert ist (T → A).

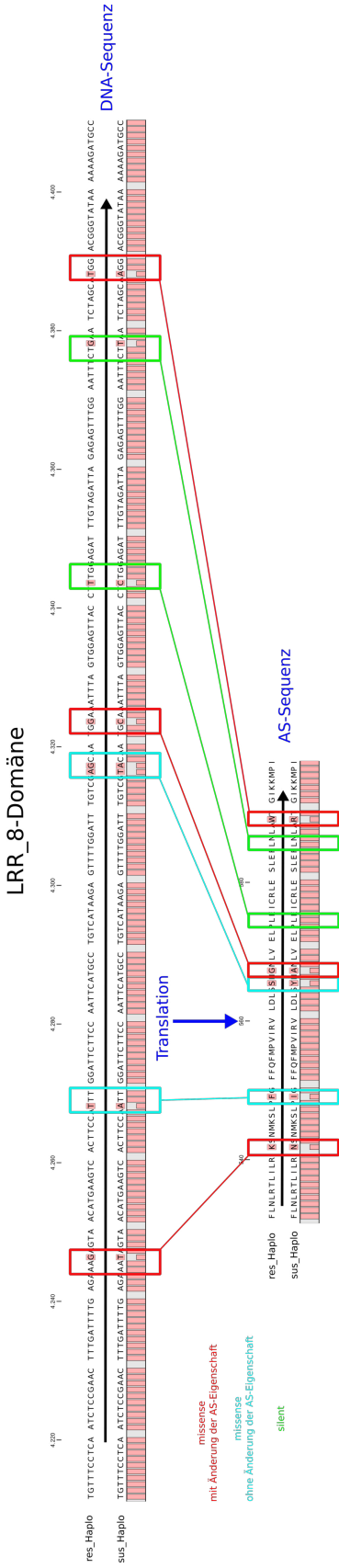


Abbildung 3.4: Vergleich der DNA-Sequenz mit der kodierten Aminosäuresequenz innerhalb der LRR-Domäne des Kandidatengens *Rpv10#1*. Im oberen Bereich sieht man die DNA-Sequenz der LRR-Domäne im Alignment zwischen dem anfälligen und resistenten Haplotypen. Darunter befindet sich die AS-Sequenz dieser kodierten Domäne, ebenfalls im Alignment zwischen beiden Haplotypen. Die verschiedenen Mutationen zwischen den Sequenzen sind farblich markiert.

Tabelle 3.4: Mutationen innerhalb der LRR-Domäne (57 AS) zwischen den beiden resistenten und anfälligen Haplotypen im Kandidatengenen *Rpv10#1*. orange - missense-Mutation mit Änderung der chemischen AS-Eigenschaft, grün - missense-Mutation ohne Änderung der chemischen AS-Eigenschaft.

Position in der AS-Sequenz	Resistenter Haplotyp		Anfälliger Haplotyp		Mutation
	DNA-Ebene	Aminosäure-Ebene	DNA-Ebene	Aminosäure-Ebene	
9	AAG	K	AAT	N	missense-Mutation
17	TTT	F	ATT	I	missense-Mutation
33	AGC	S	TAC	Y	missense-Mutation
35	GGA	G	GCA	A	missense-Mutation
42	TTG	L	CTG	L	silent-Mutation
53	CTG	L	CTT	L	silent-Mutation
57	TGG	W	AGG	R	missense-Mutation

Tabelle 3.5: Mutationen innerhalb der NB-ARC-Domäne (276 AS) zwischen den beiden resistenten und anfälligen Haplotypen im Kandidatengensystem *Rpv10#1*. orange - missense-Mutation mit Änderung der chemischen AS-Eigenschaft, grün - missense-Mutation ohne Änderung der chemischen AS-Eigenschaft.

Position in der AS-Sequenz	Resistenter Haplotyp		Anfälliger Haplotyp		Mutation		
	DNA-Ebene	Aminosäure-Ebene	DNA-Ebene	Aminosäure-Ebene			
47	GTA	V	unpolar/hydrophob	GTT	V	unpolar/hydrophob	silent-Mutation
49	ATA	I	unpolar/hydrophob	ATG	M	unpolar/hydrophob	missense-Mutation
59	ATG	M	unpolar/hydrophob	ATA	I	unpolar/hydrophob	missense-Mutation
67	CTG	L	unpolar/hydrophob	CTA	L	unpolar/hydrophob	silent-Mutation
71	CCG	P	unpolar/hydrophob	ACG	T	polar/neutral	missense-Mutation
72	ACC	T	polar/neutral	GCC	A	unpolar/hydrophob	missense-Mutation
80	CAT	H	basisch	CGA	R	basisch	missense-Mutation
90	TAC	Y	polar/neutral	TGC	C	polar/neutral	missense-Mutation
95	GCC	A	unpolar/hydrophob	TCC	S	polar/neutral	missense-Mutation
101	TTA	L	unpolar/hydrophob	TTG	L	unpolar/hydrophob	silent-Mutation
112	ATG	M	unpolar/hydrophob	TTG	L	unpolar/hydrophob	missense-Mutation
122	GAA	E	sauer	CAA	Q	polar/neutral	missense-Mutation
146	TTG	L	unpolar/hydrophob	ATG	M	unpolar/hydrophob	missense-Mutation
161	CAC	H	basisch	CGC	R	basisch	missense-Mutation
169	CTG	L	unpolar/hydrophob	TTG	L	unpolar/hydrophob	silent-Mutation
207	CGA	R	basisch	CAA	Q	polar/neutral	missense-Mutation
254	TCG	S	polar/neutral	TCA	S	polar/neutral	silent-Mutation
255	CTG	L	unpolar/hydrophob	CTA	L	unpolar/hydrophob	silent-Mutation
260	TAT	Y	polar/neutral	CAT	H	basisch	missense-Mutation
261	AGA	R	basisch	AAA	K	basisch	missense-Mutation
263	AAT	N	polar/neutral	TGG	W	unpolar/hydrophob	missense-Mutation
264	CCT	P	unpolar/hydrophob	ATT	I	unpolar/hydrophob	missense-Mutation
269	GGT	G	polar/neutral	GAT	D	sauer	missense-Mutation
274	GAA	E	sauer	GAG	E	sauer	silent-Mutation

3.1.6 Promotor-Analysen

Für die Untersuchung der Promotoren wurden die verschiedenen Promotorelemente (Ergebnisse aus den Tools (SOGO (Higo et al., 1999) und PlantCare (Lescot et al., 2002)), die in Verbindung mit Pathogenabwehr stehen, auf dem codogenen Strang annotiert. Dabei konnte in der Promotorregion des anfälligen Haplotypen des Kandidatengens *Rpv10#1* eine Länge von 629 bp und im resistenten eine Länge von 634 bp vorhergesagt werden. In diesem Bereich wurden 16 SNP's gefunden und insgesamt zwei Insertionen/Deletionen aufgedeckt. Das erste Indel hat eine Länge von 6 bp und befindet sich als Insertion im resistenten Genotypen. Dieser Bereich befindet sich innerhalb der TATA-Box.

Das Kandidatengen *Rpv10#2* zeigt für die Promotorbereiche in beiden Haplotypen eine Länge von 1323 bp. In diesem Bereich konnten beim Vergleich der beiden Haplotypen 40 SNP's identifiziert und insgesamt fünf Indels gefunden werden. Die Länge der Indels ist unterschiedlich und reicht von 1 bp bis 8 bp. Eines der längeren Indels liegt dabei in einer guaninreichen-Region. Hier liegt ein Wechsel zwischen Guanin und Adenin vor, wobei öfter Guanin auftritt. Im ersten Indel (7 bp lang) wechseln sich hingegen Adenin und Thymin ab. Somit befindet sich das erste Indel innerhalb der TATA-Box.

3.2 Kandidatengene

Zu den bioinformatischen Analysen wurden die molekularbiologischen Analysen zu den beiden Kandidatengenen *Rpv10#1* und *Rpv10#2* durchgeführt. Die beiden Kandidatengene wurden aus den BAC-Klonen (Tab.: 2.9) mit ihrem endogenen Promotor amplifiziert, isoliert und kloniert. Dies erfolgte für den anfälligen sowie für den resistenten Haplotypen.

3.2.1 Klonierung der Kandidatengene

Die Amplifikate (Abb.: 3.5) der Kandidatengene mit ihrem Promotor wurden durch homologe Rekombination (In-Fusion[®]) in den Vektor pLH9070 eingebracht. Die Längen der eingebrachten Amplifikate sind in Tabelle 3.6 aufgeführt. Vor der Sequenzierung und Klonierung wurden die Amplifikate teilweise mit *Bgl*III restringiert, wobei die unterschiedlichen Amplifikate eine verschiedene Anzahl an *Bgl*III-Schnittstellen besitzen (Tab.: 3.6). Konnte das erwartete Restriktionsmuster der Klone erzeugt werden, wurden positive Klone für die Sequenzierung vorbereitet. Nach Sicherstellung der Richtigkeit des Amplifikates erfolgte die Sequenzierung.

Tabelle 3.6: Länge der klonierten Amplifikate in dem Vektor pLH9070 (10074 bp).

Amplifikat	Insertgröße [bp]	<i>Bgl</i> III-Schnittstellen
gesamt <i>Rpv10#1</i> resistent	4899	3
gesamt <i>Rpv10#1</i> anfällig	5095	5
gesamt <i>Rpv10#2</i> resistent	2743	2
gesamt <i>Rpv10#2</i> anfällig	2477	2

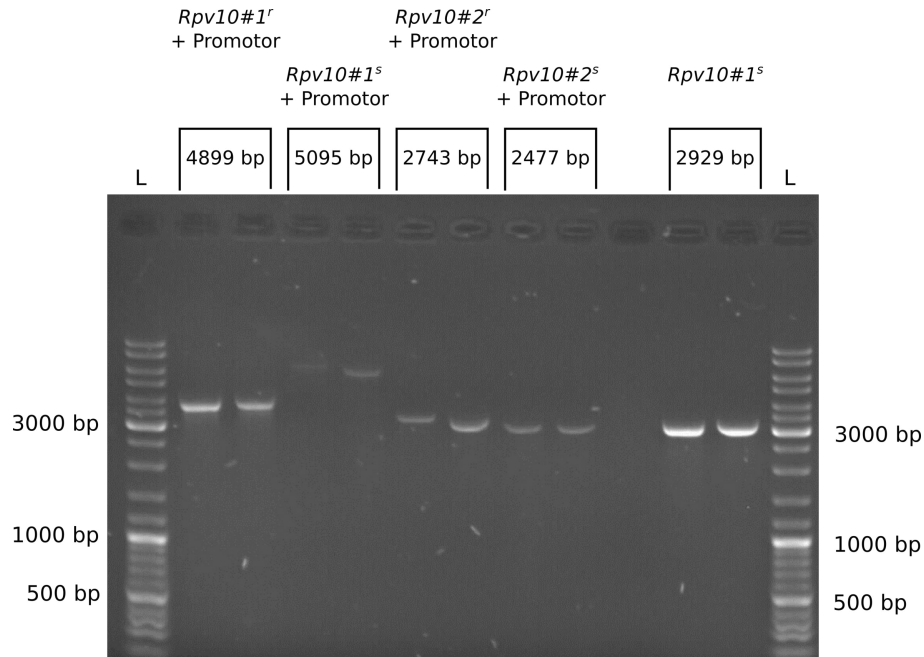


Abbildung 3.5: Amplifikate der Kandidatengene *Rpv10#1* und *Rpv10#2* mit ihrem endogenen Promotor.

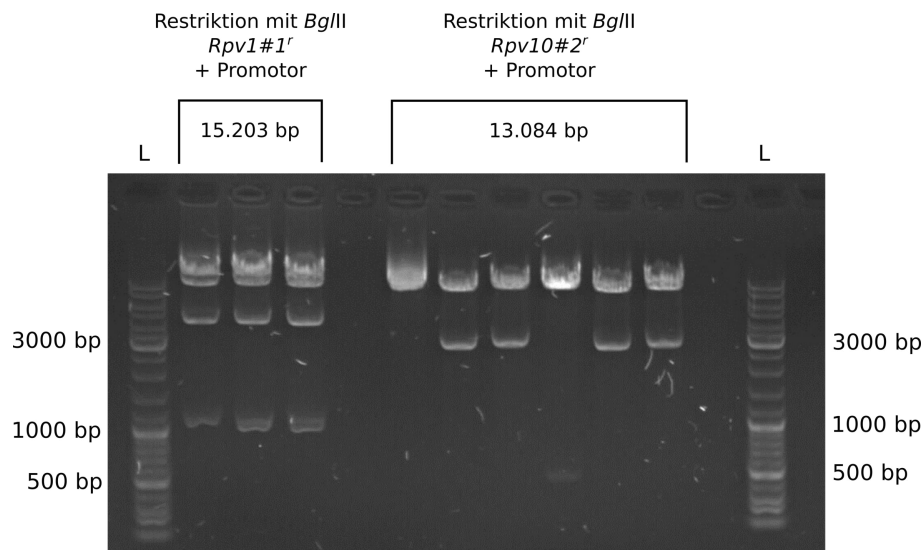


Abbildung 3.6: Restriktion der rekombinanten Plasmide mit *BglII* von *Rpv10#1* und *Rpv10#2* und ihrem endogenen Promotor nach Klonierung in den Vektor pLH9070. Die Restriktion der beiden Kandidatengene des resistenten Haplotypen ergab die erwarteten Banden. Die Länge der für *Rpv10#1* entstandenen Fragmente mit einer Größe von 10074 bp (Vektor), 4268 bp und 861 bp (Insert) sowie für *Rpv10#2*, 10074 bp (Vektor), 3010 bp (Insert).

Nach der Klonierung wurde der Vektor mit dem entsprechenden Insert wieder über eine *BglII*-

Restriktion überprüft (Abb. 3.6). Nachdem das richtige Insert im Vektor inseriert war, fand das „triparentale Mating“ statt, um anschließend die Konstrukte über *Agrobakterien*-Transformation in für Falschen Mehltau anfällige *in vitro* Pflanzen einzubringen.

3.2.2 3'-RACE-Analyse

Mit Hilfe der 3'-RACE konnten Amplifikate erzeugt werden, die jedoch bei der Sequenzierung kein Ergebnis lieferten. Absicht war es das wahre 3'-Ende des Gens *Rpv10#1* zu erhalten. Bei der Wiederholung dieser Methode sollten die Amplifikate kloniert werden.

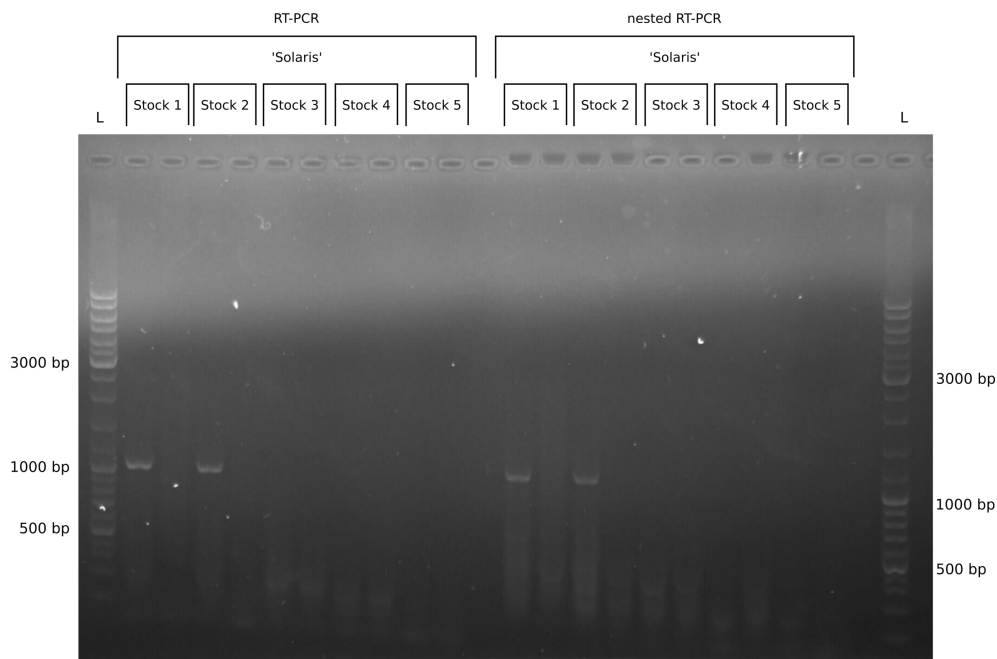


Abbildung 3.7: Amplifikate der 3'-RACE-PCR.

3.2.3 5'-RACE-Analyse

Durch die 5'-RACE konnte nur der Bereich in dem sich die vorhergesagten Domäne befinden, amplifiziert werden. Die Kombination von Oligonukleotiden im vorderen Bereich des Gens (außerhalb der NB-ARC-Domäne) erzeugten kein Amplifikationsprodukt.

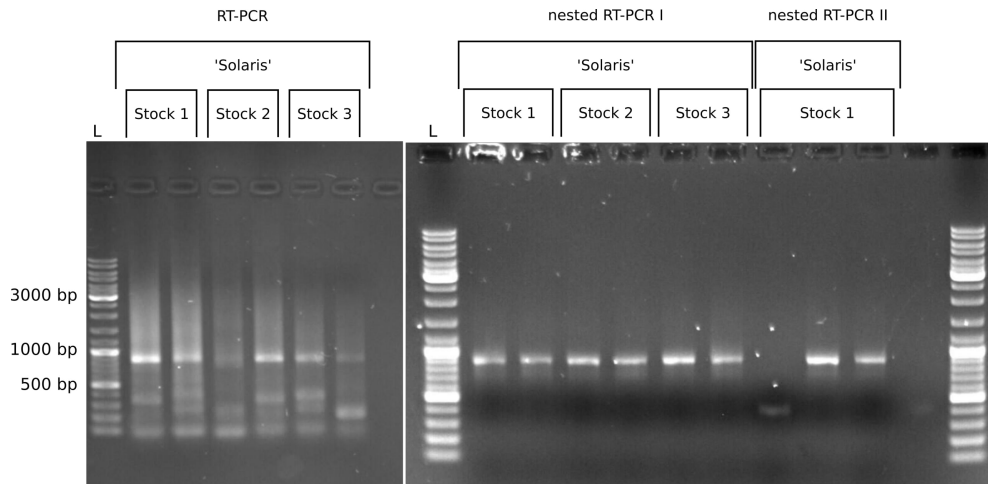


Abbildung 3.8: Amplifikate der 5'-RACE-PCR

3.2.4 CR-RT-PCR

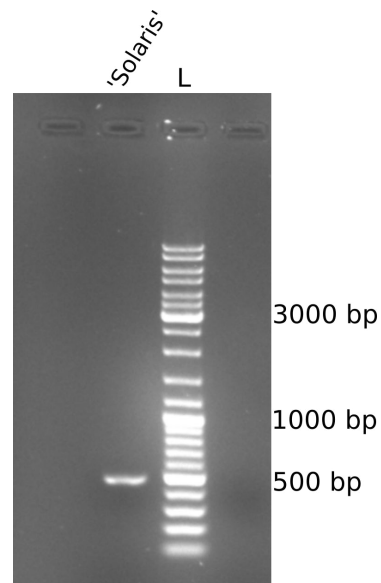


Abbildung 3.9: Amplifikate der CR-RT-PCR.

Über die CR-RT-PCR konnte das Gentranskript des anfälligen Haplotypen untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass im 3'-Bereich des Gens 481 bp entfernt werden. Innerhalb dieses deletierten Sequenzbereiches befindet sich die LRR-Domäne. Die Deletion beginnt bereits 80 bp vor der LRR-Domäne. Nach der Deletion läuft die Sequenzabfolge lückenlos bis zu einem gewissen Punkt weiter (Abb.: 3.10).

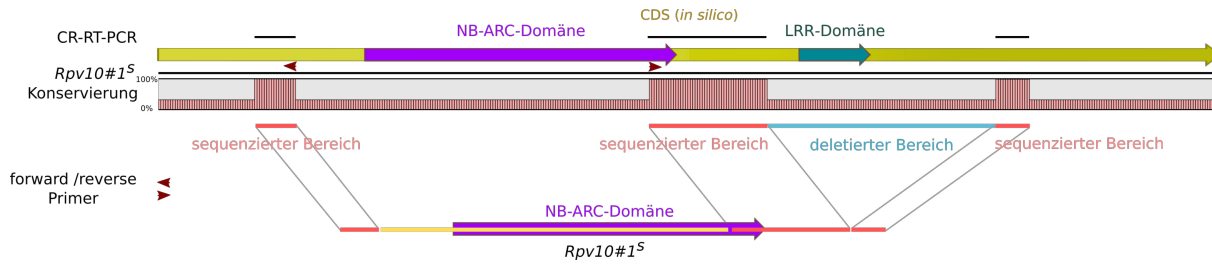


Abbildung 3.10: Darstellung des Kandidatengens *Rpv10#1^S* nach CR-RT-PCR.

3.3 RNA-Seq-Analyse

3.3.1 Anzahl der differentiell exprimierten Gene (DEGs)

Resistenzträger zeigen bereits wenige Stunden nach der Inokulation mit *P. viticola* eine spezifische physiologische Reaktion auf das Pathogen (Kortekamp and Zyprian, 2003; Figueiredo et al., 2016; Ali et al., 2012). Gene, die durch den *Rpv10* und *Rpv3* Locus vermittelt wurden und in die frühe Signalweiterleitung der Pathogenabwehr involviert sind, wurden in der RNA-Seq-Studie an zwei Zeitpunkten evaluiert. Es wurde die differentielle Genexpression vor und 6 hpi nach Inokulation mit dem Pathogen *P. viticola* untersucht.

Insgesamt durchliefen 1640 Gene eine transkriptionelle Änderung um mehr als das 2-fache. In Abb.: 3.11 ist die Anzahl aller differentiell exprimierten Gene (DEG) in den drei Genotypen (2011-003-013 (*Rpv10/Rpv10*), 2008-059-121 (*Rpv10/Rpv3*), 2008-059-020 (*Rpv-/Rpv-*)) verdeutlicht. Sie zeigt die DEG, die gemeinsam exprimiert werden, nur von zwei Genotypen oder speziell nur in einem Genotypen aktiv waren. Insgesamt werden 269 Gene nach 6 hpi von allen drei Genotypen differentiell exprimiert. Gemeinsam in den beiden resistenten Genotypen werden 307 DEG reguliert. Die Homozygote zeigt 287 DEG, die nicht in den anderen beiden Genotypen differentiell exprimiert werden. Bei 2008-059-121 (*Rpv10/Rpv3*) sind es über 400 DEGs. Im anfälligen Kontrollgenotypen waren dagegen nur 158 DEG aufzufinden.

Tabelle 3.7 zeigt eine Zusammenfassung der absoluten und relativen hoch- und ab-regulierten DEGs aller drei Genotypen. Dabei befinden sich die meisten hoch-regulierten DEGs in den beiden resistenten Genotypen. Die Homozygote (2011-003-013 (*Rpv10/Rpv10*)) besitzt insgesamt 327 mehr induzierte Gene als der anfällige Kontrollgenotyp (2008-059-020 (*Rpv-/Rpv-*)), von denen 166 Gene hoch- und 161 ab-reguliert sind. Der Genotyp mit den beiden Resistenzloki (2008-059-121 (*Rpv10/Rpv3*)) zeigt die höchste Zahl an regulierten DEGs.

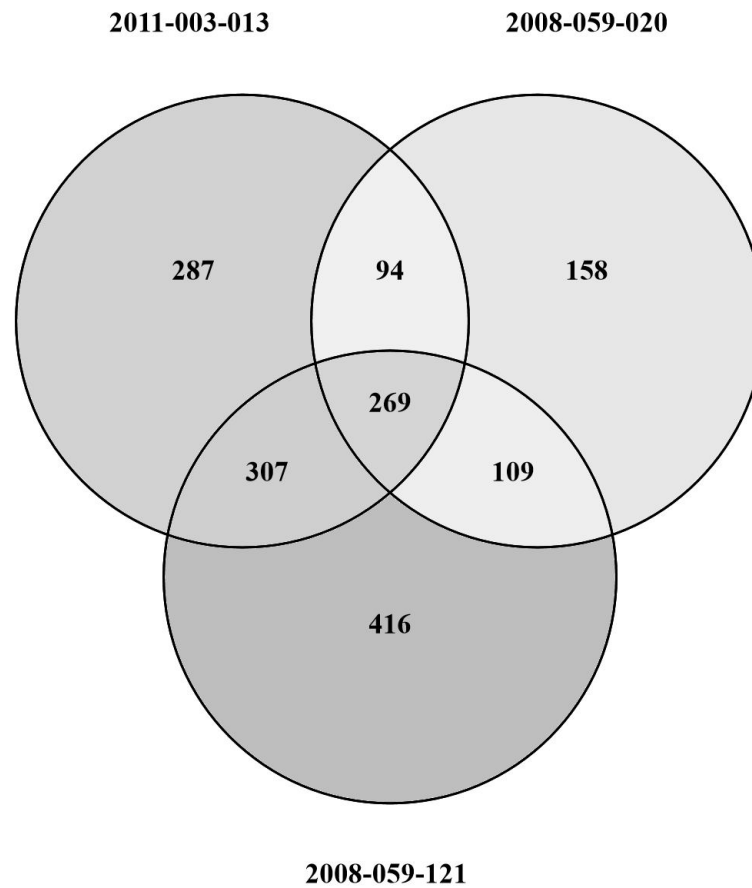


Abbildung 3.11: Darstellung der Schnittmengen zwischen allen DEGs der drei Genotypen aus der RNA-Seq. Das Venn-Diagramm der drei verwendeten Genotypen aus der RNA-Seq-Studie (2011-003-013 (*Rpv10/Rpv10*), 2008-059-121 (*Rpv10/Rpv3*), 2008-059-020 (*Rpv-/Rpv-*)) (Fröbel et al., 2019).

Tabelle 3.7: Absolute und relative Darstellung von exprimierten DEGs aller drei Genotypen aus der RNA-Seq-Berechnung (Fröbel et al., 2019).

Genotyp	Anzahl der DEGs			Anzahl der DEGs [%]	
	Insgesamt	hoch-reguliert	ab-reguliert	hoch-reguliert	ab-reguliert
2011-003-013 (<i>Rpv10/Rpv10</i>)	957	517	440	54,1	45,9
2008-059-121 (<i>Rpv10/Rpv3</i>)	1011	525	486	51,9	48,1
2008-059-020 (<i>Rpv-/Rpv-</i>)	630	351	279	55,7	44,3

3.3.2 Cluster-Analyse und Einteilung nach Gene Ontology (GO)

Die DEGs aus jedem Genotyp wurden auf Basis ihres Expressionsverhaltens in fünf verschiedene Cluster eingeteilt (Tab.: 3.8). Für die Cluster-Analyse wurde der *k*-Means-Algorithmus verwendet (Lloyd, 1982).

Table 3.8: Expression der DEGs aller drei Genotypen nach Einteilung verschiedener Cluster (Fröbel et al., 2019).

2011-003-013 (<i>Rpv10/Rpv10</i>)				
Cluster	Intervall	Expressionsänderung	Regulation	Anzahl der DEGs [%]
1	-0,64 bis 0,57	1,21	up	28,0
2	-1,08 bis 0,63	2,92	up	13,7
3	-1,26 bis 1,19	2,45	up	13,2
4	0,60 bis -0,76	1,36	down	33,5
5	1,20 bis -1,77	2,97	down	11,6
2008-059-121 (<i>Rpv10/Rpv3</i>)				
1	-0,71 bis 0,55	1,26	up	24,6
2	-1,03 bis 0,74	1,77	up	19,4
3	-1,78 bis 1,31	3,09	up	6,8
4	1,33 bis -1,29	2,62	down	8,9
5	0,60 bis -0,77	1,37	down	40,3
2008-059-020 (<i>Rpv-/Rpv-</i>)				
1	-0,65 bis 0,46	1,11	up	29,1
2	0,56 bis -0,77	1,33	down	32,7
3	-1,27 bis 0,66	1,93	up	19,1
4	1,60 bis -1,67	3,27	down	10,1
5	-1,64 bis 1,13	2,77	up	9,0

Die Gene in den Clustern wurden anhand ihrer VIT-Annotationen (<http://genomes.cribi.unipd.it/grape>) den entsprechenden GO-Termen (GO <http://geneontology.org>) zugeordnet. Dadurch konnten innerhalb der ersten großen Untergruppen („Biologische Prozesse“, „Molekulare Funktion“, „Zelluläre Komponenten“) Verteilungsunterschiede bewertet werden. Dabei zeigte sich, dass die größte Gruppe in allen Clustern und Genotypen zur Untergruppe „Biologische Prozesse“ gehört.

Die Untergruppe „Biologische Prozesse“ wurde anschließend genauer untersucht. Dabei erfolgte eine weitere Untergliederung in drei Unterklassen („Signaling“, „Defense response“, „Receptor“). Zu diesen Unterklassen gehören jeweils wieder verschiedene Sub-Terme (Tab.: A.5). Die drei Unterklassen („Signaling“, „Defense response“, „Receptor“) scheinen eine wichtige Rolle in der Pathogen-Abwehr und dem physiologischen Mechanismus dahinter zu spielen. Von diesen Genen befinden sich in den beiden resistenten Genotypen mehr als 200 Gene mehr als im anfälligen Genotyp. Die größte Unterklasse in allen Genotypen und Clustern bildet die Klasse „Signaling“. In den ab-regulierten Clustern bildet die kleinste Gruppe die Klasse „Defense response“.

Tabelle 3.9: Anteil (in Prozent) an regulierten Genen in der Untergruppe „Biologische Prozesse“ in den verschiedenen Clustern der drei Genotypen im Test (Fröbel et al., 2019).

2011-003-013 (<i>Rpv10/Rpv10</i>)					
„Biologischer Prozess“	Cluster 1 ↑	Cluster 2 ↑	Cluster 3 ↑	Cluster 4 ↓	Cluster 5 ↓
„Signaling“	37,93 %	19,67 %	45,31 %	26,58 %	37,50 %
„Defense response“	14,66 %	14,75 %	18,75 %	8,23 %	2,08 %
„Receptor“	11,21 %	19,67 %	12,50 %	12,66 %	10,42 %
#Gene im Cluster	116	61	64	158	48
2008-059-121 (<i>Rpv10/Rpv3</i>)					
„Signaling“	24,53 %	23,71 %	36,11 %	21,05 %	16,28 %
„Defense response“	18,87 %	20,62 %	16,67 %	7,89 %	8,37 %
„Receptor“	12,26 %	17,53 %	11,11 %	18,42 %	15,81 %
#Gene im Cluster	106	97	36	38	215
2008-059-020 (<i>Rpv-/Rpv-</i>)					
	Cluster 1 ↑	Cluster 2 ↓	Cluster 3 ↑	Cluster 4 ↓	Cluster 5 ↑
„Signaling“	34,72 %	23,71 %	23,08 %	29,03 %	37,93 %
„Defense response“	11,11 %	2,06 %	19,23 %	9,68 %	13,79 %
„Receptor“	16,67 %	19,59 %	17,31 %	12,90 %	6,90 %
#Gene im Cluster	72	97	52	31	29

3.3.3 Gene auf Chromosom 16

Auf Chromosom 16 befinden sich auf zwei aufeinander folgenden Clustern ein *PAL*-Cluster (598409 nach 779568 (181159 bp)) mit 15 *PAL*-Genen und ein *STS*-Cluster (17763417 nach 18195313 (431896 bp)) mit 35 *STS*-Genen. Im *PAL*-Cluster wird im homozygoten Genotyp (2011-003-013 *Rpv10/Rpv10*) das *PAL*-Gen VIT_216s0039g01110 stark hoch-reguliert (FC 635), wobei es in den anderen beiden Genotypen sehr viel weniger hoch-reguliert wird (Tab.: 3.11). Im *STS*-Cluster zeigt sich ein sehr starker Unterschied in der Aktivität der *STS*-Gene zwischen den drei Genotypen. Von den 35 *STS*-Genen, die sich in dem Cluster befinden, sind im homozygoten Genotypen (2011-003-013 *Rpv10/Rpv10*) 27 *STS*-Gene extrem hoch-reguliert (FC >1000) (Tab.: 3.13). In den anderen beiden Genotypen hingegen sind jeweils nur 15 (2008-059-121 *Rpv10/Rpv3*) und sieben (2008-059-020 *Rpv-/Rpv-*) *STS*-Gene hoch-reguliert.

In der Auswertung der RNA-Seq-Ergebnisse, sind noch weitere Gene aufgefallen, die in den verschiedenen Genotypen unterschiedlich stark hoch-reguliert erschienen. Eines dieser Gene kodiert für den Ethylen responsiven Transkriptionsfaktor 5 (ERF5, VIT_216s0013g01120). Transkripte dieses Transkriptionsfaktors werden 20-fach im anfälligen Kontrollgenotypen induziert, 52-fach im *Rpv10/Rpv3*-Genotypen und 80-fach in der homozygoten Variante. Zwei weitere interessante Gene regulatorischer Faktoren kodieren für den MYB4-Faktor (VIT_205s0049g01020), sowie den Transkriptionsfaktor WRKY75 (VIT_214s0068g01770). Beide Faktoren sind in den resistenten Genotypen sehr stark induziert. Für die Validierung dieser Ergebnisse wurde im Anschluss eine qRT-PCR mit den kodierenden Genen für *ERF5* (VIT_216s0013g01120) und *WRKY75* (VIT_214s0068g01770) durchgeführt (Ergebnisse RNA-Seq Tab.: 3.10, Ergebnisse qRT-PCR Tab.: 3.15).

Weiterhin konnten bekannte Pathogen bezogene Proteine (PR-Proteine) (van Loon et al., 2006; Jain and Kumar, 2015) gefunden werden, die eine starke Hochregulation zeigten. Bei den Genen handelt es sich um *PR1* auf Chromosom 3 und *PR10.3* auf Chromosom 5.

Interessanterweise wurden keine Resistenzgen-Analoga vom Typ NBS-LRR im *Rpv10*-Lokus auf Chromosom 9 gefunden, die zu diesem frühen Zeitpunkt der Wirt-Pathogen-Interaktion eine Induktion auswiesen.

Für die Validierung der Transkriptom-Analysen wurden auf der Liste der 100 am höchst induzierten Gene zwei Transkriptionsfaktoren (*WRKY75* und *ERF5*) ausgewählt (Tab.: 3.10).

Tabelle 3.10: Ergebnisse ausgewählter Gene aus der RNA-Seq-Analyse (Fröbel et al., 2019).

Gene	2011-003-013 (<i>Rpv10/Rpv10</i>)		2008-059-121 (<i>Rpv10/Rpv3</i>)		2008-059-020 (<i>Rpv-/Rpv-</i>)	
	Regulation	FC	Regulation	FC	Regulation	FC
<i>WRKY75</i> (VIT_214s0068g01770)	↑	>1500	↑	>1500	↑	3,0
<i>ERF5</i> (VIT_216s0013g01120)	↑	79,38	↑	52,35	↑	20,39

Tabelle 3.11: Differentielle Expression der Gene im PAL-Cluster auf Chromosom 16 (Fröbel et al., 2019).

STS-Gene des Clusters	2011-003-013		2008-059-121		2008-059-020		Funktionelle Annotation
	(<i>Rpv10/Rpv10</i>)	FC der STS-Gene	(<i>Rpv10/Rpv3</i>)	FC der STS-Gene	(<i>Rpv-/Rpv-</i>)	FC der STS-Gene	
VIT_216s0039g01100	635,361	198,002	100,624	48,666	phenylalanine ammonia-lyase		
VIT_216s0039g01110	-	100,624	346,342	66,239	phenylalanine ammonia-lyase		
VIT_216s0039g01120	-	346,342	>1000	127,671	phenylalanine ammonia-lyase		
VIT_216s0039g01130	-	>1000	1	82,616	phenylalanine ammonia-lyase		
VIT_216s0039g01140	1	1	1	1	EIF3C		
VIT_216s0039g01160	1	1	1	1	hypothetical protein		
VIT_216s0039g01170	-	831,169	1	291,517	phenylalanine ammonia-lyase		
VIT_216s0039g01220	-	1	1	>1000	plant synaptotagmin		
VIT_216s0039g01230	1	1	1	1	sorting nexin 1		
VIT_216s0039g01240	-	45,335	24,233	>1000	phenylalanine ammonia-lyase		
VIT_216s0039g01280	-	24,233	>1000	>1000	phenylalanine ammonia-lyase		
VIT_216s0039g01300	-	>1000	>1000	117,536	phenylalanine ammonia-lyase		
VIT_216s0039g01320	-	>1000	>1000	>1000	phenylalanine ammonia-lyase		
VIT_216s0039g01350	-	1	1	>1000	alanyl-trna synthetase		
VIT_216s0039g01360	179,105	>1000	>1000	>1000	phenylalanine ammonia-lyase		

Tabelle 3.12: Teil 1: Differentielle Expression der Gene im *STS*-Cluster auf Chromosom 16 (Fröbel et al., 2019).

PAL-Gene des Clusters	2011-003-013		2008-059-121		2008-059-020		Funktionelle Annotation
	(<i>Rpv10/Rpv10</i>) FC der <i>PAL</i> -Gene	(<i>Rpv10/Rpv3</i>) FC der <i>PAL</i> -Gene	(<i>Rpv10/Rpv3</i>) FC der <i>PAL</i> -Gene	(<i>Rpv-/Rpv-</i>) FC der <i>PAL</i> -Gene	(<i>Rpv-/Rpv-</i>) FC der <i>PAL</i> -Gene	(<i>Rpv-/Rpv-</i>) FC der <i>PAL</i> -Gene	
VIT_216s0100g00760	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500	stilbene synthase	
VIT_216s0100g00780	>1500	>1500	>1500	>1500	139,663	stilbene synthase	
VIT_216s0100g00800	>1500	>1500	417,996	>1500	>1500	stilbene synthase	
VIT_216s0100g00810	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500	stilbene synthase	
VIT_216s0100g00830	>1500	>1500	255,58	120,515	264,453	stilbene synthase	
VIT_216s0100g00840	>1500	>1500	538,897	110,884	140,312	stilbene synthase	
VIT_216s0100g00850	>1500	>1500	146,956	1	1	stilbene synthase 4-like	
VIT_216s0100g00860	1081,3	1	1	1	1	hypothetical protein	
VIT_216s0100g00870	1	>1500	160,824	65,96	430,437	stilbene synthase 4-like	
VIT_216s0100g00880	>1500	>1500	>1500	430,437	94,919	stilbene synthase 4-like	
VIT_216s0100g00900	>1500	>1500	268,567	236,932	163,374	stilbene synthase	
VIT_216s0100g00910	>1500	>1500	324,685	163,374	252,445	stilbene synthase	
VIT_216s0100g00920	>1500	>1500	>1500	378,135	139,847	stilbene synthase 4-like	
VIT_216s0100g00930	>1500	>1500	>1500	>1500	41,341	stilbene synthase	
VIT_216s0100g00940	>1500	>1500	378,135	146,628	1	stilbene synthase 4-like	
VIT_216s0100g00950	>1500	>1500	>1500	1	1	hypothetical protein	
VIT_216s0100g00960	>1500	>1500	1	589,539	170,065	stilbene synthase	
VIT_216s0100g00970	1	809,1	309,764	484,085	191,699	stilbene synthase 4-like	
VIT_216s0100g00990	809,1	>1500	103,907	159,236	>1500	stilbene synthase	
VIT_216s0100g01000	>1500	>1500	863,646	>1500	>1500	stilbene synthase 4-like	
VIT_216s0100g01010	230,8	>1500	>1500	1	1	stilbene synthase 4-like	
VIT_216s0100g01020	>1500	>1500	1	>1500	>1500	stilbene synthase	
VIT_216s0100g01040	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500	stilbene synthase	
VIT_216s0100g01060	1	>1500	1	1	1	stilbene synthase	
VIT_216s0100g01070	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500	stilbene synthase	
VIT_216s0100g01080	1	1	1	1	1	hypothetical protein	

Tabelle 3.13: Teil 2: Differentielle Expression der Gene im STS-Cluster auf Chromosom 16.

PAL-Gene des Clusters	2011-003-013 (<i>Rpv10/Rpv10</i>) FC der PAL-Gene	2008-059-121 (<i>Rpv10/Rpv3</i>) FC der PAL-Gene	2008-059-020 (<i>Rpv-/Rpv-</i>) FC der PAL-Gene	Funktionelle Annotation
VIT_216s0100g01100	37,0	>1500	1	stilbene synthase
VIT_216s0100g01110	-	-	-	stilbene synthase
VIT_216s0100g01120	>1500	>1500	8,694	stilbene synthase
VIT_216s0100g01130	>1500	>1500	36,161	stilbene synthase
VIT_216s0100g01140	>1500	196,186	73,482	stilbene synthase
VIT_216s0100g01150	>1500	>1500	65,67	stilbene synthase
VIT_216s0100g01160	>1500	>1500	>1500	stilbene synthase
VIT_216s0100g01170	>1500	1433,77	158,69	stilbene synthase

3.3.4 Die Gene des *Rpv10*-Lokus in der RNA-Seq-Analyse

Nach den RNA-Seq-Analysen konnte auch die Expression der neun Gene des *Rpv10*-Lokus bewertet werden (Tab. 3.14). Einige dieser Gene sind dabei hoch- andere herab-reguliert. Die beiden Kandidatengene sind in blau dargestellt (VIT_209s0002g03940 (*Rpv10*#1) und VIT_209s0002g03980 *Rpv10*#2). Der FC für VIT_209s0002g03980 (*Rpv10*#2) liegt in allen Genotypen zwischen 1,102 und 1,79 so dass keine große Veränderung erkennbar ist. Anders ist es jedoch beim zweiten Kandidatengen (VIT_209s0002g03940). In den beiden resistenten Genotypen (2011-003-013, 2008-059-121) wird das Gen herab-reguliert während es im anfälligen (2008-059-020) hoch-reguliert wird. Die Expressionsdifferenz liegt dabei bei 3,663 zwischen dem homozygoten und 4,247 zwischen 2008-059-121 und dem anfälligen Genotypen.

Das Gen mit der Annotation VIT_209s0002g03910 zeigt in diesen ersten Stunden der Infektion sehr starke Unterschiede zwischen den beiden resistenten und dem anfälligen Genotypen. Dabei liegt der FC in den beiden resistenten Genotypen bei 1500 während er im anfälligen Genotypen bei 1 liegt. Ebenfalls interessant ist das Gen VIT_209s0002g04000. Hier liegt in den beiden resistenten Genotypen eine hoch-Regulation von FC 1,059 (2011-003-013) und 1,401 (2008-059-121) vor. Im anfälligen Genotypen wird das Gen mit einen FC von -1,38 herab-reguliert.

Nach den QTL-Berechnungen liegen die Gene VIT_209s0002g03920 und VIT_209s0002g03910 nicht im *Rpv10*-Lokus. Diese wurden jedoch bei der Sequenzierung der Bereiche mit einbezogen.

Tabelle 3.14: Expression der Gene des *Rpv10*-Lokus.

Gen-ID	2011-003-013 (<i>Rpv10/Rpv10</i>)		2008-059-121 (<i>Rpv10/Rpv3</i>)		2008-059-020 (<i>Rpv-/Rpv-</i>)		Sequenzhomologie zu	Funktion
	FC	Regulation	FC	Regulation	FC	Regulation		
VIT_209s0002g04020	4,243	↑	1,629	↑	2,347	↑	Ankyrin repeat family	Proteinfaltung
VIT_209s0002g04010	1,85	↑	1,362	↑	1,968	↑	Ankyrin repeat-containing protein	Signaltransduktion
VIT_209s0002g04000	1,059	↑	1,401	↑	-1,38	↓	Chaperonin	Proteinfaltung
VIT_209s0002g03980	1,553	↑	1,102	↑	1,79	↑	AP2/ERF	Transkriptionsfaktor
VIT_209s0002g03950	-4,528	↓	-1500	↓	-3,246	↓	BnaC06g05Z50D	Transmembranprotein
VIT_209s0002g03940	-2,0	↓	-2,584	↓	1,663	↑	RPS5-like Protein	Resistenzen
VIT_209s0002g03930	-1,398	↓	-2,39	↓	-1,368	↓	TRNAse Z4	Endoribonuklease Aktivität
VIT_209s0002g03920	1500	↑	1	↑	1	↑	NDH-dependent cyclic electron flow 1	katalytische Aktivität
VIT_209s0002g03910	1500	↑	1500	↑	1	↑	Aquaporin TIP	Wasserkanalprotein

„Large gap read mapping“ im *Rpv10*-Lokus und „Transcript discovery“

Für diese Untersuchung wurde die Sequenz des *Rpv10*-Lokus aus dem anfälligen und dem resistenten Haplotypen sowie die „Reads“ aus der RNA-Seq-Analyse der unterschiedlichen Genotypen genutzt. In den Abbildungen 3.12 (Kandidatengen *Rpv10#2*) und 3.13 (Kandidatengen *Rpv10#1*) sind die Alignments zwischen dem anfälligen und resistenten Haplotypen des *Rpv10*-Lokus und den Zeitpunkten 0 hpi und 6 hpi dargestellt.

Im Kandidatengen *Rpv10#2* (Abb. 3.12) wird im anfälligen Genotypen zum Zeitpunkt 0 hpi ein Gentranskripte vorhergesagt. Dieses befindet sich zum Teil innerhalb der vorhergesagten Promotorregion, zwischen Gen und Promotor und im Gen. Die Vorhersage des Transkriptes findet nur in diesem Haplotypen und zu diesem Zeitpunkt statt. Zu den anderen Zeitpunkten und ebenfalls im resistenten Haplotypen erfolgt keine Vorhersage.

Existierende Unterschiede und Abweichungen in den Ergebnissen aus der RNA-Seq-Analyse zu den Studien speziell am *Rpv10*-Lokus. Für das „Large gap read mapping“ wurden die sequenzierten BAC-Klon-Sequenzen verwendet und für die RNA-Seq-Analyse zu diesem Zeitpunkt aktuellste *P. viticola*-Genom (Yin et al., 2017). So wurden im „Large gap read mapping“ keine Transkripte im Bereich von *Rpv10#2* vorhergesagt (ausgenommen im anfälligen Haplotypen bei 0 hpi).

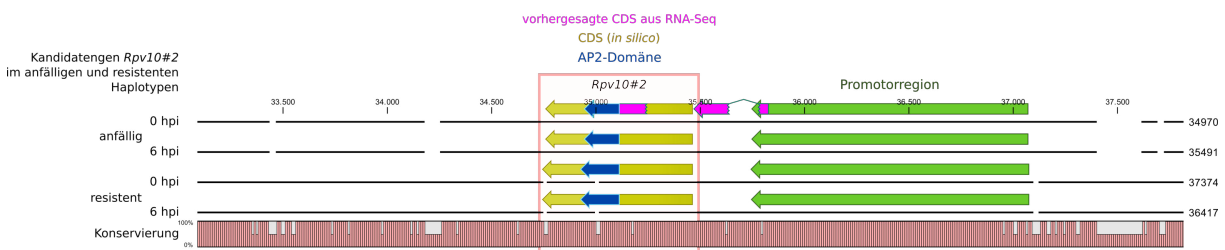


Abbildung 3.12: Vorhersage des Gentranskriptes im Kandidatengen *Rpv10#2*. Die Abbildung zeigt den Bereich, in dem sich das Kandidatengen *Rpv10#2* auf der DNA-Sequenz befindet. Es wurde der anfällige und der resistente Haplotyp zu den jeweils zwei Zeitpunkten 0 hpi und 6 hpi gegeneinander angeordnet. Die Konservierung zeigt an welchen Stellen der Sequenz ein SNP auftritt. Grün Promotorbereich; gelb CDS; pink CDS aus der RNA-Seq-Analyse; blau AP2-Domäne.

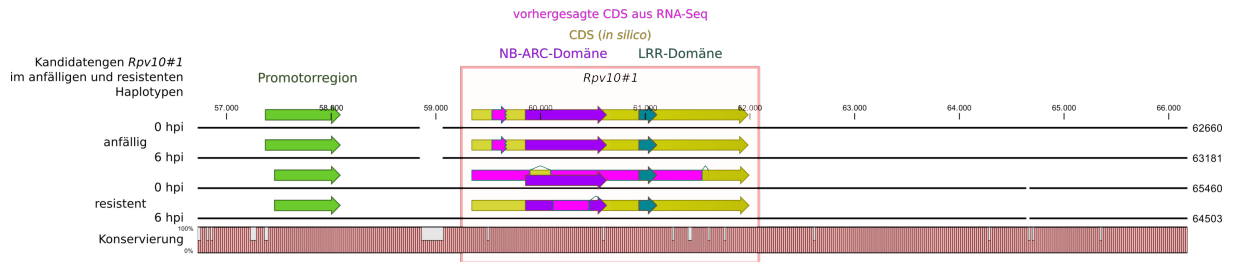


Abbildung 3.13: Vorhersage des Gentranskriptes im Kandidatengen *Rpv10#1*. Die Abbildung zeigt den Bereich in dem sich das Kandidatengen *Rpv10#1* auf der DNA-Sequenz befindet. Es wurde der anfällige und der resistente Haplotyp zu den jeweils zwei Zeitpunkten 0 hpi und 6 hpi gegeneinander angeordnet. Die Konservierung zeigt an welchen Stellen der Sequenz ein SNP auftritt. Grün Promotorbereich; gelb CDS; pink CDS aus der RNA-Seq-Analyse; lila NB-ARC-Domäne; oliv-grün LRR-Domäne.

Im Kandidatengen *Rpv10#1* (Abb. 3.13) wird im anfälligen Haplotypen zu beiden Zeitpunkten das gleiche Gentranskript vorhergesagt. Dieses befindet sich innerhalb der CDS des Gens und wenige Basenpaare vor der NB-ARC-Domäne. Im resistenten Haplotypen ist die Vorhersage im Vergleich zu dem anfälligen unterschiedlich. Diese Unterschiede zeigen sich hier auch zwischen den verschiedenen Zeitpunkten. Vor der Inokulation mit dem Pathogen wird ein ausgedehntes Gentranskript über die CDS des Gens vorhergesagt. Dieses beginnt mit der CDS und schließt nahezu alle Domänen mit ein. Lediglich wenige Basenpaare der NB-ARC-Domäne sind aus der Vorhersage ausgeschlossen. Nach 6 hpi verändert sich die Vorhersage des Transkriptes und reduziert sich auf einen begrenzten Bereich von 363 bp (Gesamtlänge der Domäne 783 bp) innerhalb der NB-ARC-Domäne.

3.4 Validierung der RNA-Seq-Analyse mittels qRT-PCR

Für die Validierung der RNA-Seq-Ergebnisse wurde eine qRT-PCR an zwei verschiedenen Genen durchgeführt. Dafür wurden die Gene für die Transkriptionsfaktoren, die für WRKY75 und ERF5 kodieren, in drei verschiedenen Genotypen (Solaris (*Rpv10/Rpv3.3*), Sibera (*Rpv10/Rpv3.3*), Müller-Thurgau (*Rpv-/Rpv-*)) direkt vor der Inokulation sowie 6 hpi danach untersucht (Tab.: 3.15). Aus den RNA-Seq-Analysen geht hervor, dass das für WRKY75 kodierende Gen in den beiden resistenten Genotypen stark induziert wird (Tab.: 3.10).

Der TF *ERF5* ist bereits aus voran gegangenen Studien (an 'Regent' (*Rpv3.1*-Träger)) bekannt und wird mit einer Abwehr gegen *P. viticola* in Verbindung gebracht (Moser, 2015). Dieser zeigt in den RNA-Seq-Analysen eine Hochregulation in allen drei Genotypen, wobei der FC in der Homozygoten (2011-003-013 (*Rpv10/Rpv10*)) am höchsten und beim anfälligen Kontrollgenotypen (2008-059-020 (*Rpv-/Rpv-*)) am niedrigsten ist.

In den qRT-PCR-Analysen wurden zwei Referenzgene (*SAND*, *UBC*) genutzt sowie drei Genotypen, die von der RNA-Seq-Analyse abweichen, da die Genotypen aus der RNA-Seq-Studie nicht verfügbar waren. Durch die Beurteilung von Standardfehler und der -abweichung zeigte sich, eine bessere Verrechnung mit dem Referenzgen *SAND*. Die Analysen zeigen, dass die beiden

TF nach einer Inokulation mit dem Pathogen induziert sind (Tab.: 3.15). Demnach ist der höchste FC in der resistenten Sorte 'Solaris' gefunden worden. Die anfällige Sorte 'Müller-Thurgau' zeigt für die beiden getesteten TF immer die niedrigsten FC-Werte.

Tabelle 3.15: Ergebnisse der qRT-PCR - 6 hpi (Fröbel et al., 2019).

	SAND			UBC		
	WRKY75 (VIT_214s0068g01770)	ERF5 (VIT_216s0013g01120)	WRKY75 (VIT_214s0068g01770)	ERF5 (VIT_216s0013g01120)	WRKY75 (VIT_214s0068g01770)	ERF5 (VIT_216s0013g01120)
'Solaris' (<i>Rpv10/Rpv3</i>)	FC	10,41	3,16	8,21	2,5	
	SE	0,21	0,21	2,17	0,69	
	SD	0,37	0,36	3,76	1,2	
	MOCK-FC	2,45	0,93	3,29	1,25	
'Sibera' (<i>Rpv10/Rpv3</i>)	FC	3,94	2,15	4,23	2,2	
	SE	0,17	0,18	1,07	0,28	
	SD	0,29	0,31	1,85	0,48	
	MOCK-FC	0,78	1,73	0,85	1,89	
'Müller-Thurgau' (<i>Rpv-/Rpv-</i>)	FC	1,75	0,75	2,43	1,04	
	SE	0,29	0,23	0,59	0,32	
	SD	0,5	0,4	1,03	0,56	
	MOCK-FC	1,68	0,83	2,15	1,08	

3.5 Mikroskopie

Für die mikroskopischen Infektionsstudien wurden verschiedene Resistenzloki tragende Genotypen untersucht. Hierfür wurde ein Set aus sechs Resistenzträgern und einem anfälligen Genotypen zusammengestellt. Die anfällige Vergleichssorte ist 'Gutedel'. Unter den resistenten Genotypen befinden sich jeweils zwei mit dem gleichen *Rpv*-Lokus. Zu den untersuchten Sorten, die zu diesem Zeitpunkt wissentlich nur *Rpv10* tragen, zählen 'Rondo' und 'Golubok'. Die Sorten 'Solaris' und 'Sibera' tragen *Rpv10/Rpv3.3*. 'Merzling' (als ein Elternteil von 'Solaris') und 'Saphira' tragen *Rpv3.3*.

Zu jedem Genotypen wurden drei biologische und zwei technische Wiederholungen bewertet. Für alle Wiederholungen wurde jeweils eine Negativkontrolle mitgeführt. Diese Blattscheiben wurden mit steril filtriertem Wasser inkubiert und zu jedem Zeitpunkt mit gefärbt und bewertet.

Die Proben aus den ausgewählten Zeitpunkten (6 hpi, 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi, 4dpi, 7 dpi) wurden durch Anilin-Blau und NBT gefärbt und anschließend mikroskopisch bewertet. Die Negativkontrollen waren in allen Fällen negativ.

3.5.1 Anilin-Blau-Färbung

Nach 6 hpi sind die Zoosporen in allen Genotypen zu den Stomata geschwommen, haben ihre Geißeln abgeworfen und haben begonnen, eine Penetrationshyphe auszubilden. Diese ist zu diesem Zeitpunkt bereits durch die Stomata eingedrungen. Stereomikroskopisch zeigen sich keine sichtbaren Unterschiede zwischen den Genotypen. Auch nach 24 hpi zeigen sich makroskopisch keine Veränderungen bzw. Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen. In der mikroskopischen Analyse kann man gut das Wachstum der Penetrationhyphe in die darunter liegenden Intrazellularräume erkennen. Dabei werden in regelmäßigen Abständen bereits Haustorien in die umliegenden Zellen eingestülpt. Teilweise kann man eine beginnende Verzweigung dieser Primärhyphe erkennen. 48 hpi kommt es makroskopisch zu ersten sichtbaren Unterschieden. In den Genotypen mit *Rpv10/Rpv3.3* zeigen sich erste Reaktionen infolge des Pathogenbefalls. Dabei sieht man kleine braune Stellen innerhalb der inokulierten Bereiche. Die anderen Genotypen zeigen diese sichtbaren Veränderungen auf die Reaktion zu diesem Zeitpunkt nicht. Betrachtet man diesen Zeitpunkt mikroskopisch, werden deutliche Unterschiede in der Ausbreitung des Myzels sichtbar. Nach zwei Tagen hat sich das Pathogen im anfälligen Genotypen bereits stark verbreitet. Es hat sich mehrfach verzweigt und bildet zahlreiche Haustorien zur Nahrungsaufnahme. Einen geringen Unterschied sieht man zu den *Rpv3.3* tragenden Genotypen 'Merzling' und 'Saphira'. Das Myzel ist nicht so stark verzweigt und das Wachstum nicht so schnell. Dennoch zeigt sich ein fast gleiches Bild. In den *Rpv10* tragenden Sorten 'Rondo' und 'Golubok' ist der Unterschied zum anfälligen 'Gutedel' eindeutig. Die Penetrationshyphe ist in der Länge gewachsen zeigt jedoch kaum bis keine Verzweigungen des pathogenen Myzels. Haustorien werden in regelmäßigen Abständen gebildet. In den *Rpv10/Rpv3.3* tragenden Genotypen 'Solaris' und 'Sibera' zeigt sich eine noch stärkere Abgrenzung. Das Myzel der Penetrationshyphe wirkt dünn bis fädig und eine Verzweigung findet kaum statt. Teilweise scheint das Wachstum der Penetrationshyphe stagniert. Haustorien werden vereinzelt gebildet. Nach 72 hpi zeigen stereomikroskopisch alle Resistenzloki tragenden Genotypen eine Veränderung an der Infektionsstelle. Diese ist bei den *Rpv3.3* tragenden Sorten am schwächsten durch kleine braune Flecken geprägt

und in den *Rpv10/Rpv3.3* tragenden am stärksten. In 'Gutedel' findet keine makroskopische Veränderung statt. Mikroskopisch breitet sich das Myzel im anfälligen Genotypen weiter innerhalb der Interkostalfelder aus. Es verzweigt sich weiter und bildet Haustorien. Das Myzel in den *Rpv3.3* tragenden Genotypen wächst vergleichsweise langsamer. Trotzdem verzweigt es sich und bildet Haustorien. Im Gegensatz zu 'Gutedel' wirkt das Myzelwachstum nicht zu stark innerhalb eines Interkostalfeldes. Die *Rpv10* tragenden Genotypen zeigen ein ähnliches Wachstum wie die *Rpv3.3* tragenden. Nur scheint hier die Verzweigungsrate noch etwas schwächer. In der Mehrheit der Fälle zeigt sich eine lange Penetrationshyphne deren Verzweigungsversuche unterbrochen werden. Haustorien werden regelmäßig gebildet. Davon weiter abzugrenzen sind die *Rpv10/Rpv3.3* tragenden Sorten. Das Myzelwachstum ist bei diesen Genotypen stark limitiert. Die Hyphen wirken dünn, wobei kaum Haustorien gebildet werden. Die Verzweigung der Hyphen nimmt nocheinmal, im Vergleich zu den *Rpv10*-Trägern, ab.

Nach vier Tagen Infektionszeit treten vereinzelt Sporangioophoren in der anfälligen Sorte auf. In den resistenten Genotypen wird die Braunfärbung im Bereich der Infektion immer stärker und die braunen Flecken werden größer. Mikroskopisch nimmt das Myzel im anfälligen 'Gutedel' den Platz des gesamten Interkostalfeldes ein. Es ist stark verzweigt und bildet vermehrt Haustorien. Eine Abstufung dazu zeigen die *Rpv3.3* tragenden Sorten. Diese zeigen verzweigtes Myzel welches zum Ausbreiten im Interkostalfeld noch genügend Platz besitzt. Dabei sind ca. drei Viertel des Interkostalfeldes ausgefüllt. Es werden regelmäßig Haustorien gebildet. In den *Rpv10* tragenden Genotypen zeigen sich einige Verzweigungen deren Wachstum langsam fortschreitet. Von einem Interkostalfeld ist jedoch nicht einmal die Hälfte durch Myzel ausgefüllt. Bei dem *Rpv10/Rpv3.3* tragenden Genotypen 'Solaris' ist das Wachstum weiterhin stark eingeschränkt. Es scheint als würde nur die anfängliche Penetrationshyphne durch das Mesophyll wachsen. Verzweigungen treten kaum bis gar nicht auf. Dabei ist die Anzahl der Haustorien gering. Die Sorte 'Sibera' unterscheidet sich zu diesem Zeitpunkt von 'Solaris'. Das Myzel ist weiterhin dünn und wenig verzweigt, jedoch ist eine größere Fläche durch das Wachstum eingenommen. Am siebten Tag nach Inokulation zeigt sich auf dem anfälligen Genotypen ein dichter Sporangienrasen. In den beiden *Rpv3.3* tragenden Genotypen treten Sporangien aus einigen Stomata aus. Die anderen Genotypen zeigen kein Sporangienwachstum, jedoch eine Verstärkung der Braunfärbung als lokale Reaktion auf die Infektion. Mikroskopisch zeigt sich bei 'Gutedel' keine sichtbare Zunahme des Myzels. Dabei sind die Interkostalfelder vollkommen mit Myzel ausgefüllt. In den beiden *Rpv3.3* tragenden Sorten scheint das Myzelwachstum auch stagniert zu sein. Nach wie vor befindet sich innerhalb des Interkostalfeldes noch Platz für das Wachstum des pathogenen Myzels. Ein ähnliches Bild zeigt sich auch in den anderen beiden „Resistenzklassen“. Das Wachstum scheint auch hier nicht vorangeschritten (Siehe Abb.: 3.16, Abb.: 3.14, Abb.: 3.15).

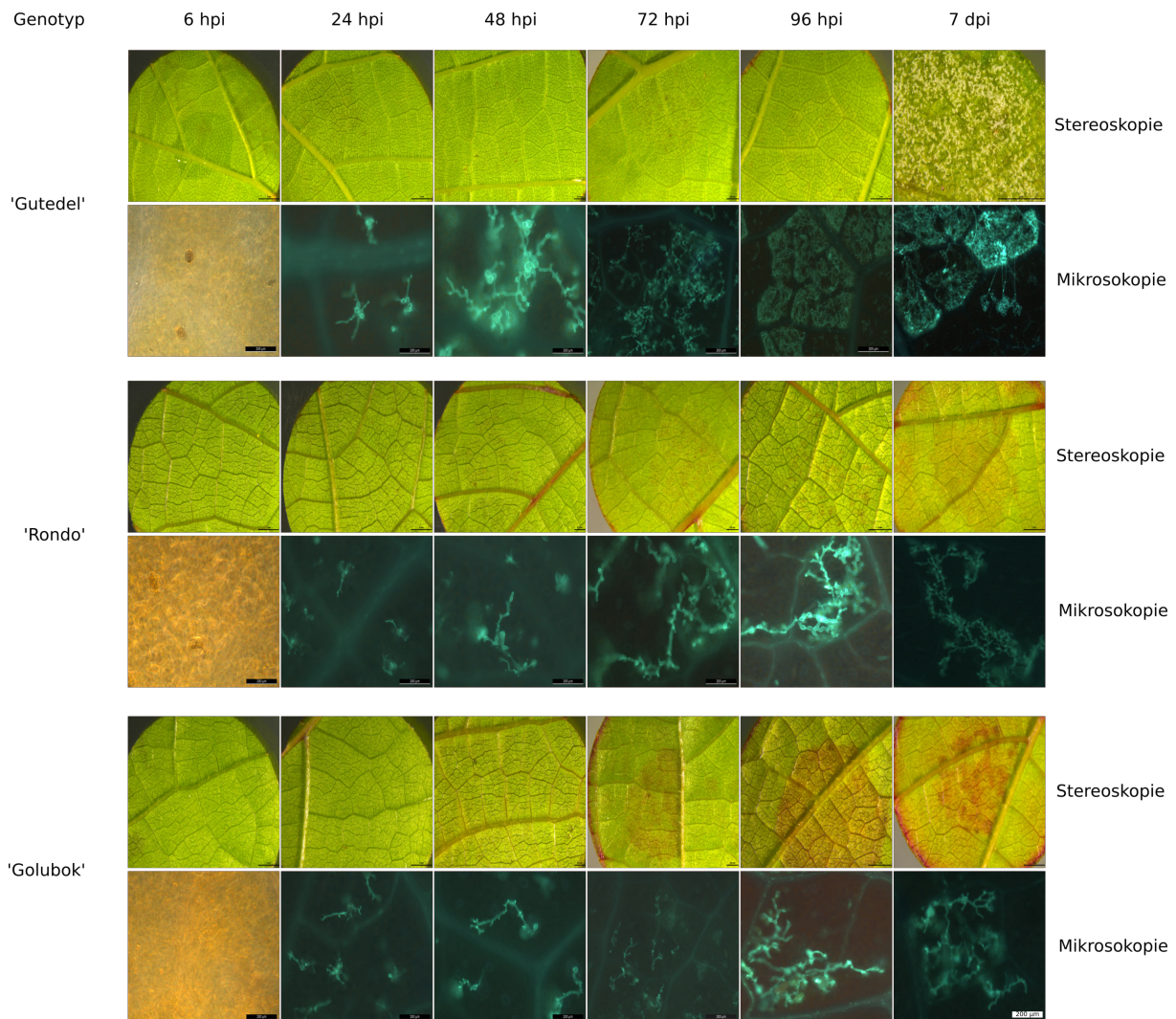


Abbildung 3.14: Vergleich der mikroskopisch verfolgten Infektionsversuche der *Rpv10*-Träger mit dem anfälligen Kontrollgenotypen.

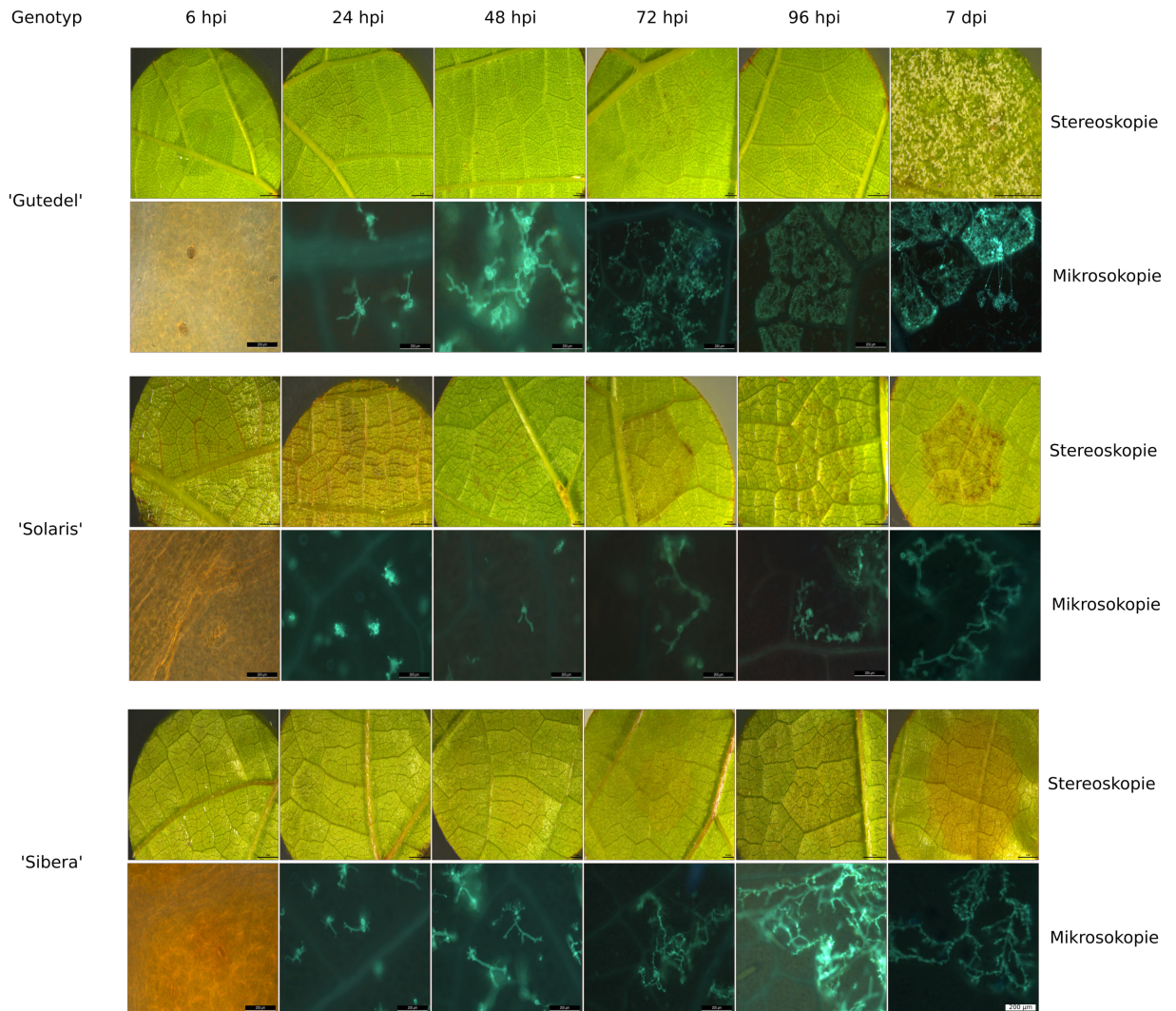


Abbildung 3.15: Vergleich der mikroskopisch verfolgten Infektionsversuche der *Rpv10/Rpv3.3*-Träger mit dem anfälligen Kontrollgenotypen.

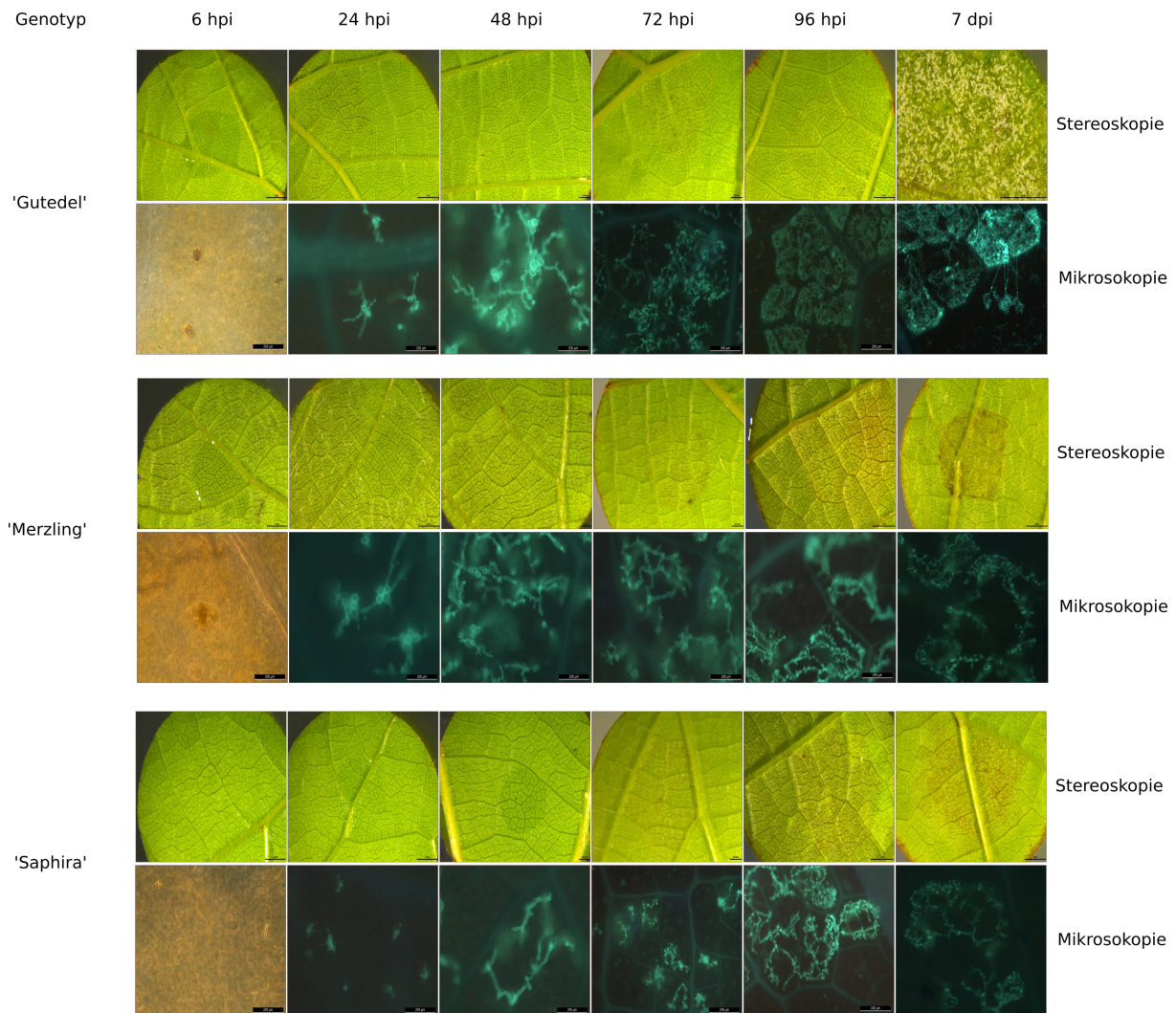


Abbildung 3.16: Vergleich der mikroskopisch verfolgten Infektionsversuche der *Rpv3.3*-Träger mit dem anfälligen Kontrollgenotypen.

In der Veröffentlichung von Yu et al. (2012) erfolgt eine klare Einteilung der Resistenz mit einer Abstufung von immun zu anfällig (Abb.: 3.17 und Abb.: 3.18). Anhand dieser Klassifizierung können die Resultate aus den mikroskopischen Aufnahmen der verschiedenen Genotypen ebenfalls eingeteilt werden.

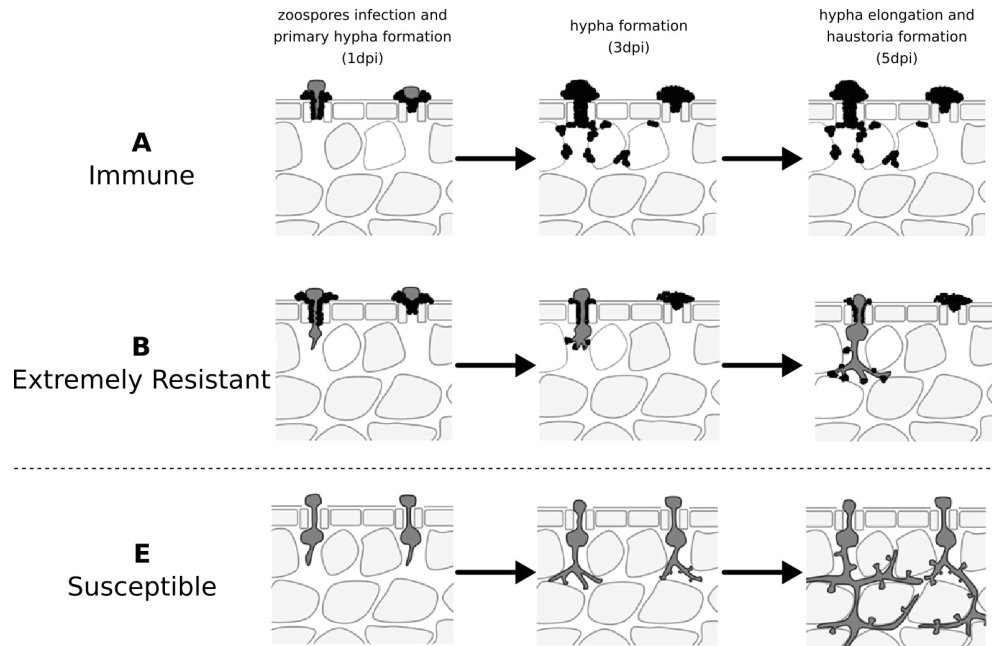


Abbildung 3.17: Vergleichsreferenz immun bis resistent (Yu et al., 2012).

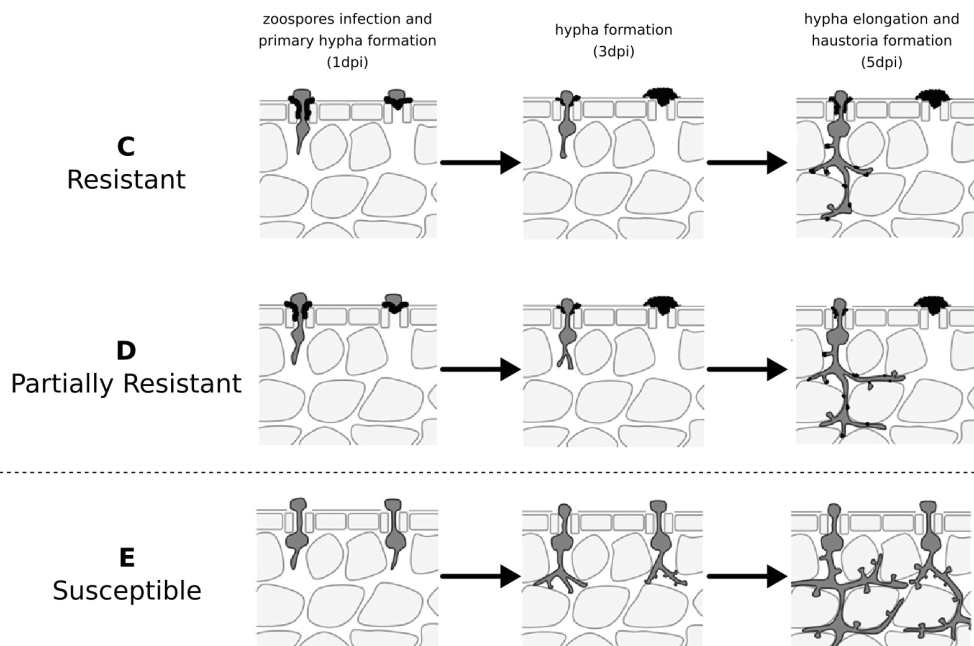


Abbildung 3.18: Vergleichsreferenz resistent bis leicht resistent (Yu et al., 2012).

Anhand dieses Bewertungsschemas könnte man die beiden *Rpv3.3* tragenden Genotypen 'Merzling' und 'Saphira' in die Klasse D (parziell resistent) und die anderen beiden Resistenzträger in Klasse C (resistent) einordnen.

3.5.2 Nachweis von Superoxiden - NBT-Färbung

Für die Analyse der Superoxide wurden drei verschiedene Zeitpunkte nach experimenteller Inokulation (24 hpi, 48 hpi, 72 hpi) untersucht. Zudem wurden die sieben Genotypen aus der Anilin-Blau-Mikroskopie-Studie gefärbt ('Gutedel', 'Merzling', 'Saphira', 'Rondo', 'Golubok', 'Sibera', 'Solaris').

Über alle drei Zeitpunkte wurden im anfälligen 'Gutedel' keine Superoxide gebildet. In den resistenten Genotypen werden nach 24 hpi die ersten Superoxide gebildet. Dabei unterscheidet sich die Menge des Auftretens zwischen den drei Gruppen. Die wenigsten braunen Verfärbungen zeigen sich bei den *Rpv3.3*-Trägern, die meisten und flächenmäßig größeren Bereiche bilden die *Rpv10/Rpv3.3*-Träger. Die Anzahl der braunen Areale sowie die Größe der Fläche nimmt bis zum Zeitpunkt 72 hpi zu, wobei in den Gruppe der *Rpv10/Rpv3.3*-Träger sichtlich die meisten Verfärbungen eintreten (Abb.: 3.19).

3.5.3 Nachweis von Stilbenen in der Mikroskopie

Bei den Mikroskopie-Studien zeigte sich durch die Anilin-Blau-Färbung nach 24 hpi ein blauer Schein unterhalb der Stomata (Abb.: 3.20). Diese Erscheinung konnte in allen resistenten Genotypen beobachtet werden. Der anfällige Vergleichsgenotyp zeigte diese Erscheinung nicht. Auffällige war, dass alle Stomata die diesen Effekt zeigten, keine Penetration durch das Pathogen erlitten.

3.5.4 Berechnung der Myzelfläche im Vergleich zwei und sieben Tage nach Inokulation

Für die Berechnung der Fläche an infiltrierenden Myzel zwischen den verschiedenen Genotypen wurde der Mittelwert über alle Wiederholungen (insgesamt sechs) gebildet und in Tabelle 3.16 dargestellt. Durch die Berechnung der Myzelfläche kann der Klassifizierung von Yu et al. (2012) ein weiterer Bewertungsfaktor zugeteilt werden.

Tabelle 3.16: Mittelwerte der errechneten Myzelfläche zwei und sieben Tage nach Inokulation.

Genotyp	Fläche A [μm] nach 2 dpi	SE	SD	Fläche A [μm] nach 7 dpi	SE	SD
'Gutedel'	627448,3	8906,1	15425,8	653628,5	27150,9	54301,8
'Merzling'	187969,9	26700,7	46246,9	219421,5	17442,5	30211,2
'Saphira'	183791,2	5091,2	8818,3	190497,3	5113,3	8856,5
'Rondo'	37255,8	1780,7	3084,3	74287,3	852,3	1704,6
'Golubok'	49881,7	1061,1	1837,8	75103,7	9634,5	215434
'Sibera'	63578,0	9008,4	15603,1	128092,2	6696,5	14973,7
'Solaris'	66301,1	2185,5	3785,4	123132,9	5164,2	8944,6

Es zeigt sich, dass mit Abstand die größte Fläche im anfälligen Genotypen beobachtet wird. Aus den resistenten Genotypen gehen drei Gruppierungen hervor. Dabei sind die *Rpv3.3*-Träger am

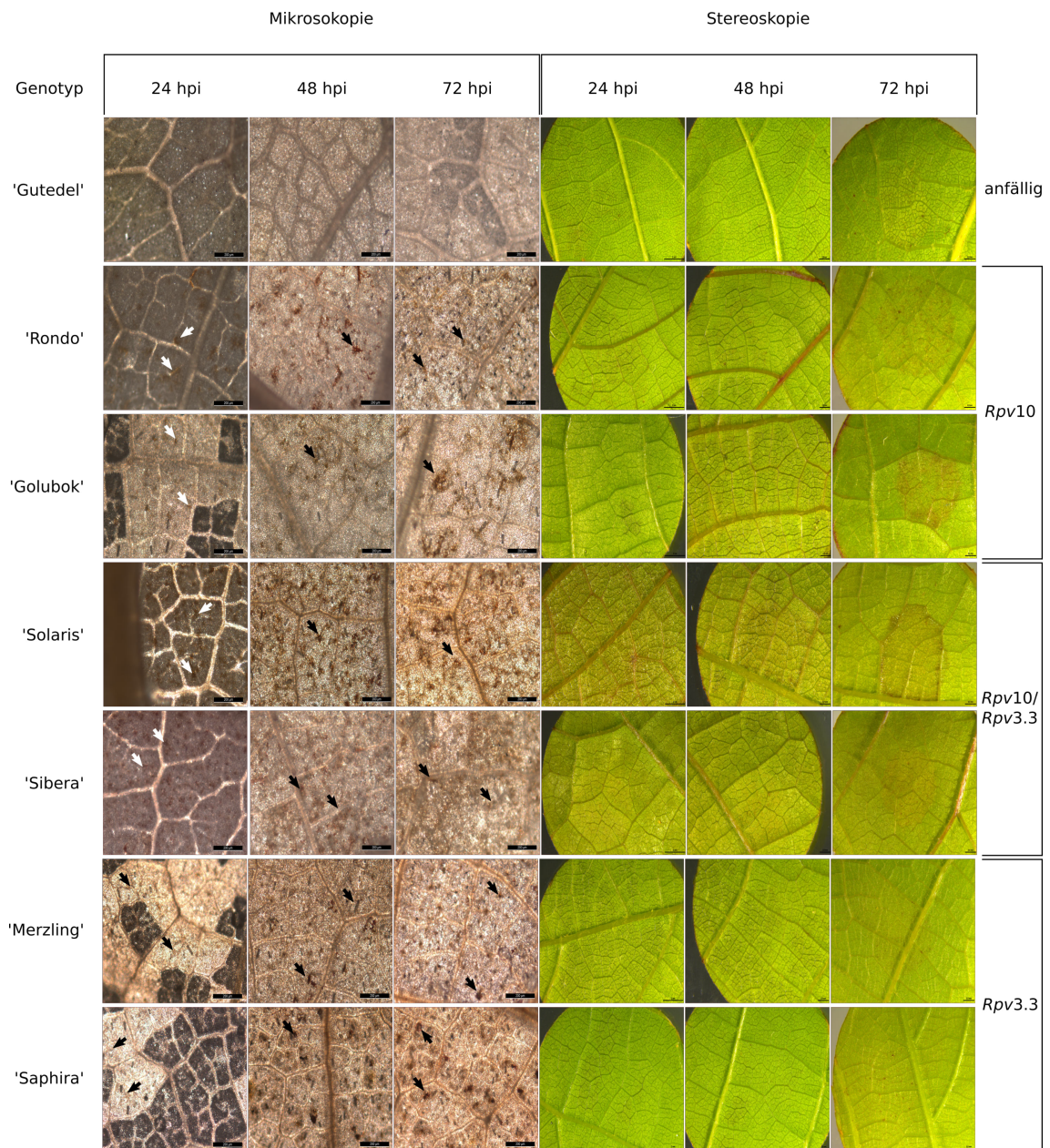


Abbildung 3.19: Nachweis der Superoxide zu verschiedenen Zeitpunkten nach Testinokulation. In den verschiedenen Genotypen ist eine unterschiedliche Intensität an gebildeten Superoxiden durch die NBT-Färbung nachzuweisen. Die Pfeile markieren dabei die braunen Bereiche (oxidative Reaktionen), die durch die Färbung sichtbar werden.

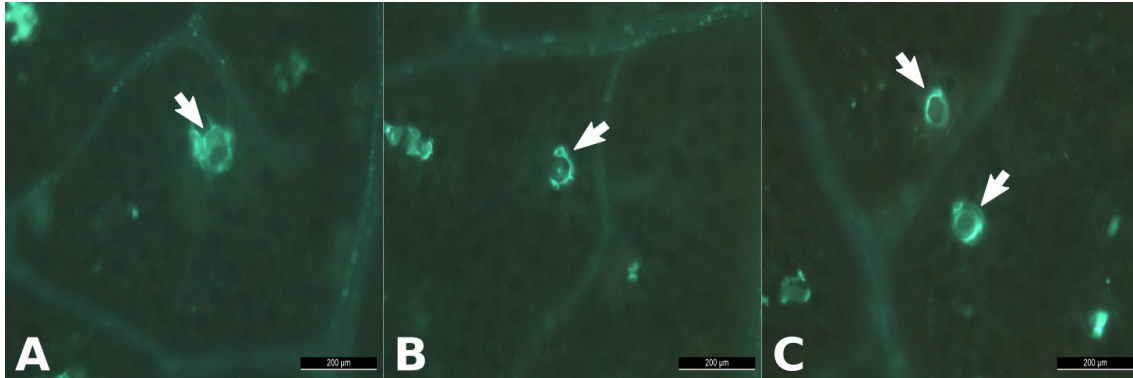


Abbildung 3.20: Mikroskopischer Nachweis von Stilbenen nach 24 hpi an resistenten Genotypen. Im mikroskopischen Bild (Anilin-Blau-Färbung) zeigt sich unterhalb einiger Stomata ein blauer Schein (Pfeil). Dieser ist ein Nachweis für die Bildung des *trans*-Resveratrols nach der Penetration des Pathogens in den resistenten Genotypen.

nächsten an der anfälligen Vergleichsorte. Danach folgt die Gruppe der *Rpv10/Rpv3.3*-Träger (Tab.: 3.21). Im Vergleich der Fläche an gebildeten Myzel von zwei Tagen auf sieben Tage, kann man eine Erhöhung feststellen. Der Unterschied verringert sich nach drei Tagen und zeigt nach vier Tagen nur noch einen marginalen Unterschied im Vergleich zu den sieben Tagen. Nach 6 hpi und 24 hpi treten innerhalb der verschiedenen Genotypen keine Unterschiede bezüglich der Fläche des infiltrierten Myzels auf.

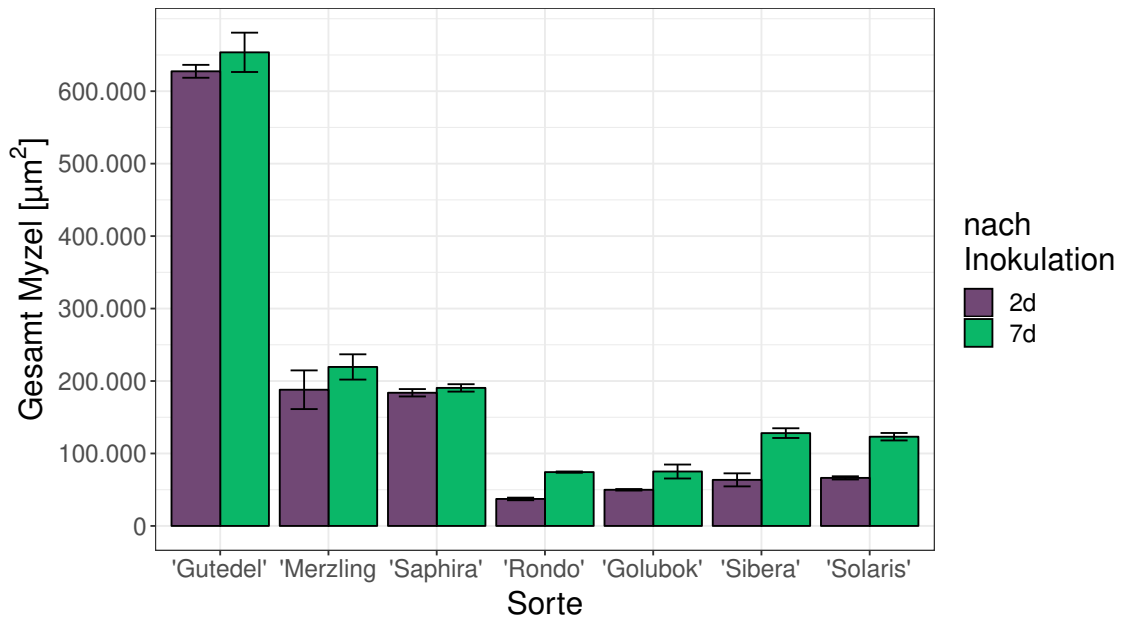


Abbildung 3.21: Vergleich des Zuwachses an Myzel von zwei zu sieben Tagen nach experimenteller Inokulation mit *P. viticola*.

3.5.5 Analyse von Winterknospen

Bei der Untersuchung der Knospen konnten in jedem mikroskopierten Genotypen entweder Oosporen oder Oogonien gefunden werden. Dabei wurde in den ersten beiden Versuchsmonaten (Januar, Februar) keine Fortpflanzungsorgane gefunden. Dafür zeigte sich innerhalb dieser Testperiode vegetatives Myzel an den Knospenschuppen. Erst im dritten Versuchsmonat März konnten diese pathogenen Elemente beobachtet werden. Es wurden dabei weibliche wie auch männliche Fortpflanzungsorgane mikroskopisch nachgewiesen. In Abbildung 3.22 ist eine kleine Auswahl an mikroskopischen Aufnahmen gezeigt. Dabei kommen die sexuellen Fortpflanzungsorgane sowohl in anfälligen ('Gutedel', 'Müller-Thurgau', 'Pinot blanc') als auch in resistenten ('Solaris', 'Rondo') Genotypen vor.

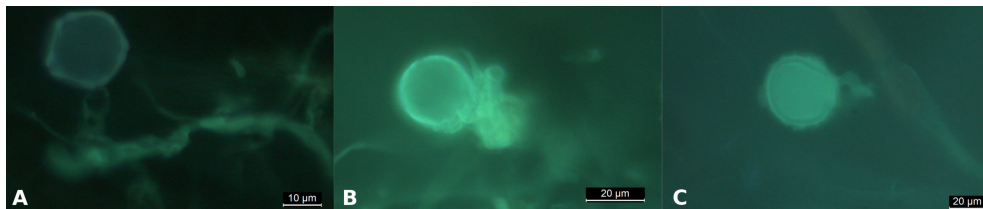


Abbildung 3.22: Oogonien an der Innenseite der Knospenschuppen. (A) und (B) zeigen jeweils die Knospenschuppen von 'Müller-Thurgau', mit einem Oogonium mit oogonalem Stiel an einer Hyphe. (C) In der letzten Abbildung entwickeln sich ebenfalls sexuelle Fortpflanzungsorgane von *P. viticola* innerhalb der Knospenschuppen in der Sorte 'Solaris' als resistenten Genotypen (*Rpv10/Rpv3.3*).

In einem zusätzlichen Versuch wurde beobachtet, ab wann unter optimalen Bedingungen Oosporen gebildet werden. Hierbei zeigte sich die Bildung von Oosporen nach 7 dpi unter kontrollierten Bedingungen (Abb.: 3.23).

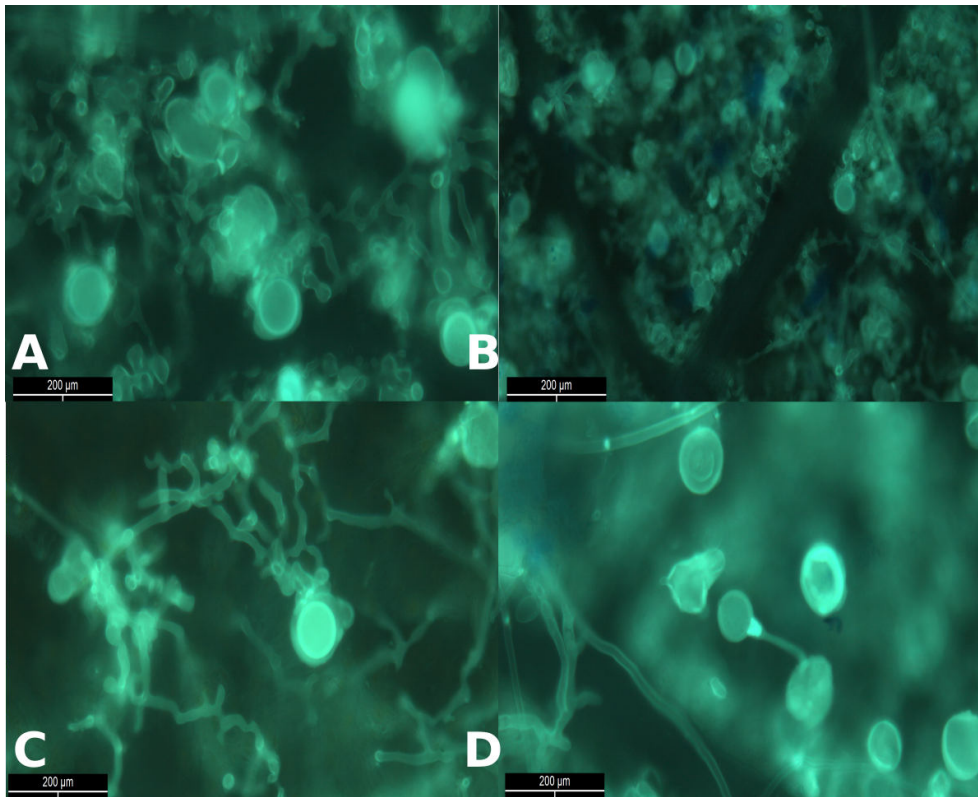


Abbildung 3.23: Oogonien auf der Blattoberseite nach 7 dpi. (A) und (B) zeigen einen mikroskopischen Überblick. (C) und (D) zeigen eine Nahaufnahme der Oogonien.

3.5.6 Histologische Studien mit *P. viticola*

Für die Aufklärung, wie *P. viticola* in die Knospen gelangt sein kann, wurde eine histologische Studie durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Genotypen ausgewählt (anfällige: 'Müller-Thurgau', 'Riesling', 'Pinot noir', 'Pinot blanc', resistente: 'Solaris'). Zunächst wurden 'Müller-Thurgau' und 'Riesling' im Gewächshaus inokuliert und die Blätter nach 6 dpi mikroskopiert. Es zeigte sich an verschiedenen Stellen, dass *P. viticola* in der Lage ist, die Blattadern zu überwinden. Diese gelten nach aktueller Literatur als Barriere für das Pathogen, so dass es zu einer „natürlichen“ Eindämmung der Infektion kommt. Im weiteren Verlauf des Jahres wurde das Probenet erweitert. Dabei wurden insgesamt vier anfällige und eine resistente Sorte zu verschiedenen Zeitpunkten im Jahr analysiert.

Für die Analysen wurden nicht nur die Blätter betrachtet. Weitere Pflanzenorgane waren junge Beeren (BBCH 71, Lorenz et al. (1994)), reife Beeren mit deutlichen Befallserscheinungen (BBCH 81, Lorenz et al. (1994)), Samen, Blattstiele und Triebspitzen. Diese Pflanzenorgane wurden im Feldtest betrachtet.

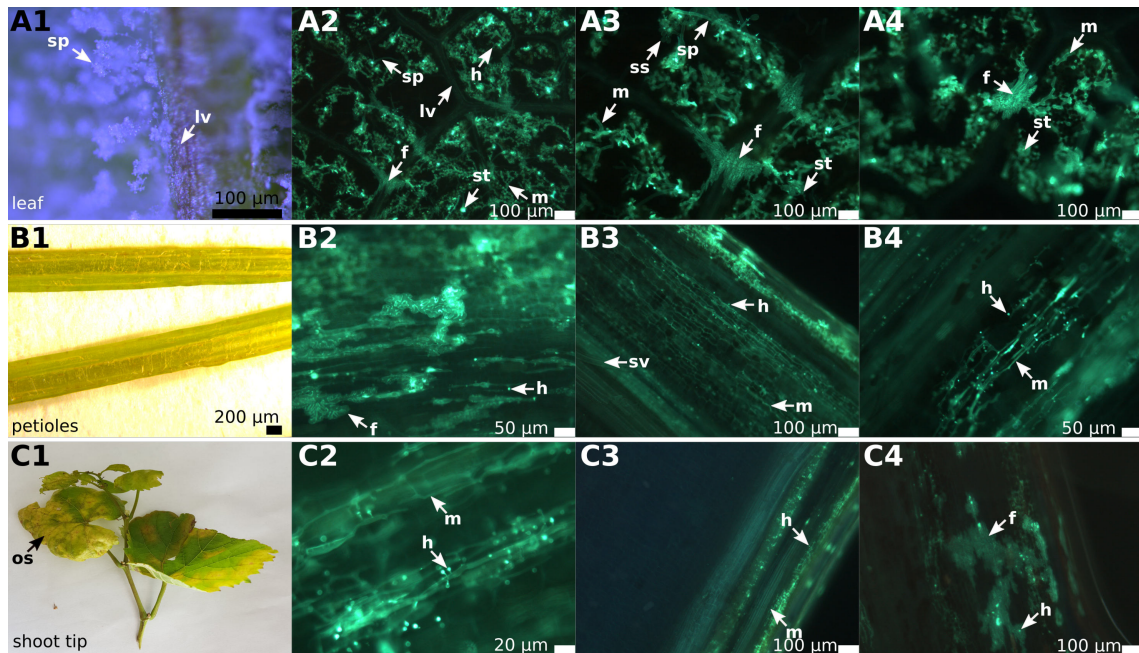


Abbildung 3.24: Überblick über *P. viticola* infizierte Blätter, Blattstiele und Triebspitzen. Der infizierte Genotyp ist 'Pinot blanc'. Links sind stereomikroskopische Aufnahmen dargestellt (1). Die danach folgenden Abbildungen sind mikroskopische Aufnahmen (2-4). Diese sind mit KOH behandelt und anschließend mit Anilin-Blau gefärbt. (A1-4) mit *P. viticola* befallenes Blatt mit typischen pathogenspezifischen Elementen. (B1-4) zeigt, wie sich das Pathogen in den Blattstielen ausbreitet und wächst. (C1-4) Der untere Teil der Triebspitze wurde analysiert. Auch hier sieht man, wie das Pathogen durch das Gewebe wächst (Fröbel and Zyprian, 2019). sp Sporangiothoren, m Myzelium, lv Blattadern, f fächerartige Hyphen, h Haustorien, sv Spiralgefäße, ss Sporangien, st Stomata, os Öl-Flecken.

Es zeigten sich zu jedem der Zeitpunkte (von April bis August 2018) pathogenspezifische Elemente in den Organen. Die Abbildung 3.24 zeigt am Beispiel von 'Pinot blanc' den Befall der Blätter unter Ausbildung von fächerartigen Hyphen, um die Blattadern zu überwinden (A). Desweiteren sieht man ein gerichtetes Wachstum in den Blattstielen und Triebspitzen (B,C). In allen diesen Organen werden Haustorien zur Nahrungsversorgung des Pathogens ausgebildet. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die fächerartigen Hyphen in der Lage sind, Haustorien auszubilden (Abb. 3.25).

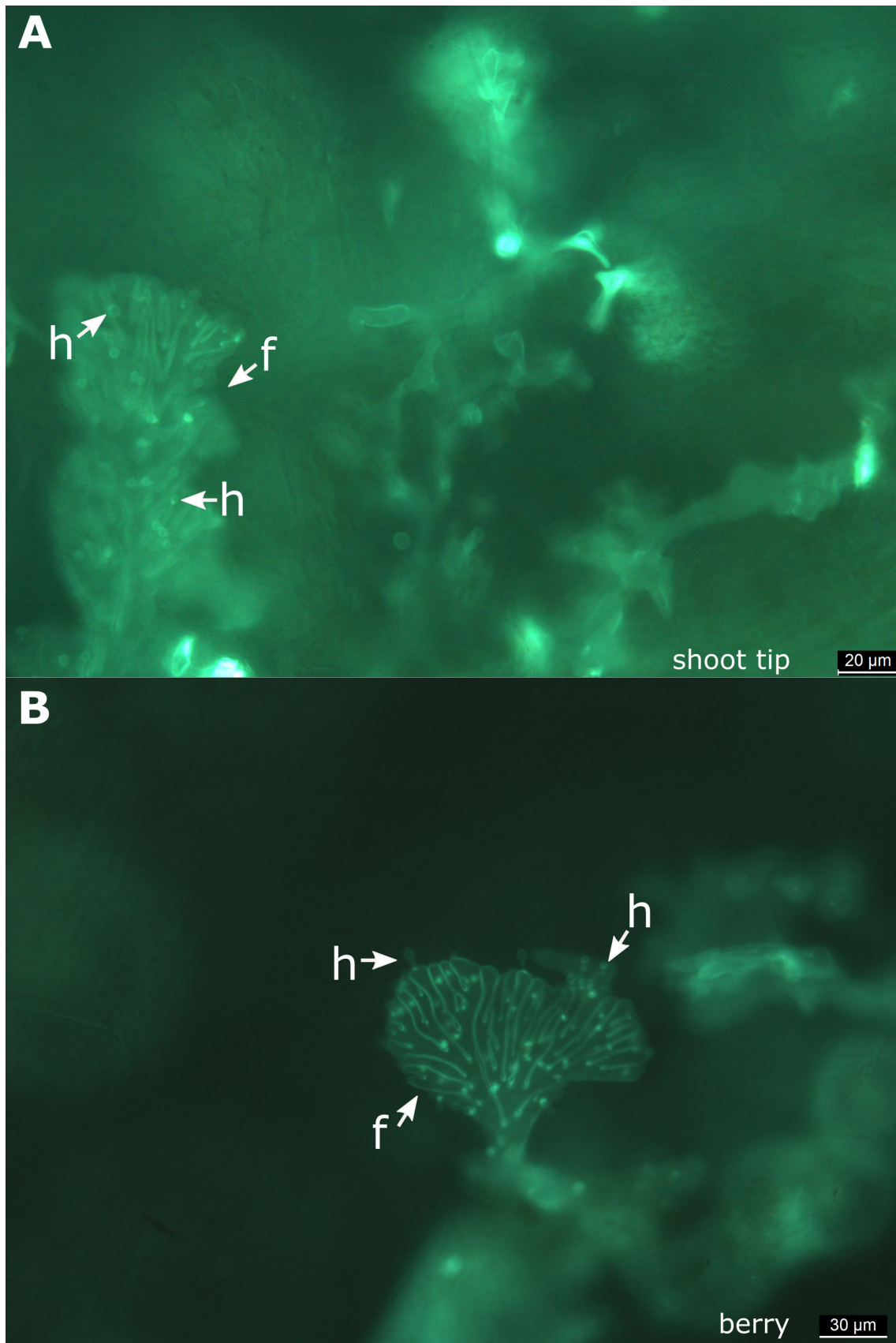


Abbildung 3.25: Bildung von Haustorien an „fächerartigen“ Hyphen. Die Proben stammen zum einen von einer Triebspitze (**A**) und zum anderen von einer Beere (**B**) von 'Müller-Thurgau' (Fröbel and Zyprian, 2019). f fächerartige Hyphen, h Haustorien.

In den Beeren und Samen kann man ebenfalls pathogenspezifische Strukturen im Gewebe nachweisen. In der Abbildung 3.26 sind die jungen frisch infizierten Beeren (BBCH 71 (Lorenz et al., 1994)) und deren Samen dargestellt. Äußerlich sind die Beeren komplett mit einem Sporangien-Rasen überzogen. Im Inneren kann man pathogenspezifisches Myzel erkennen. Dieses bildet in den Beeren und den Samen gleichsam Haustorien aus.

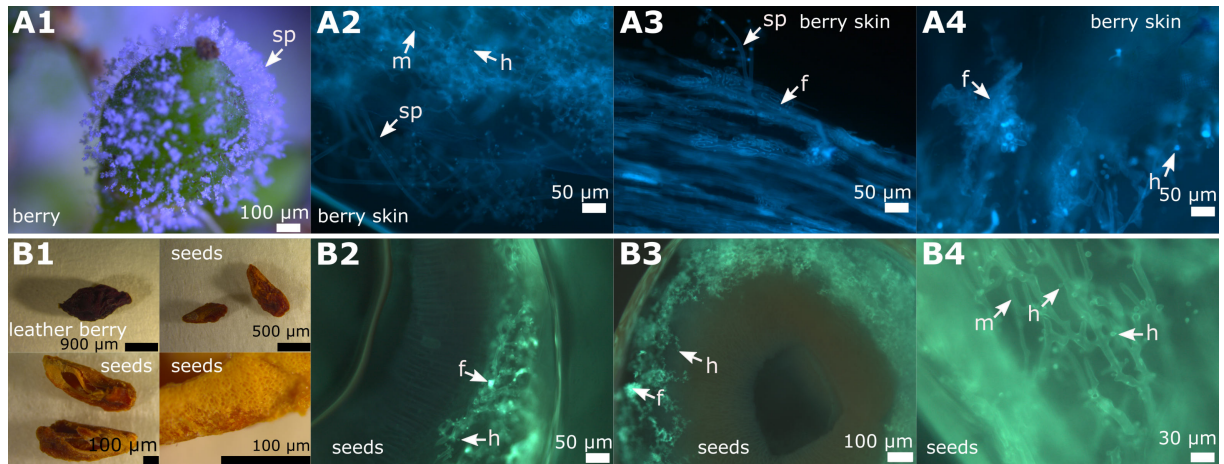


Abbildung 3.26: Übersicht von jungen infizierten Beeren und deren Samen an 'Pinot blanc'. **(A)** Junge infizierte Beere (BBCH 71 (Lorenz et al., 1994)). **(A1)** Steriomikroskopische Aufnahme mit deutlich sichtbaren Infektionsanzeichen durch Sporangio-phoren um die gesamte Beere. **(A2-4)** Mikroskopische Aufnahmen der Beerenhaut. **(B)** Lederbeeren im BBCH 81 (Lorenz et al., 1994). **(B2-4)** Entnommene Samen aus der gefallen Beere (Fröbel and Zyprian, 2019). m Myzelium, f fächerartige Hyphe, sp Sporangio-phore, h Haustorien.

Die Abbildung 3.27 zeigt eine Übersicht von Beeren im Entwicklungsstadium BBCH 81 (Lorenz et al., 1994) und die daraus entnommenen Samen von 'Pinot blanc'. Man sieht äußerlich an den typischen Lederbeeren keine Sporangio-phoren mehr. Beim Aufschneiden kann man jedoch an den Samen Sporangio-phoren erkennen. Die Ausprägung der fächerartigen Hyphen kann unterschiedlich sein. Das heißt, es kommen Proben vor, bei denen ein Myzelwachstum mikroskopisch nachweisbar ist. In anderen Proben werden wenige fächerartige Hyphen ausgebildet. Und im Extremfall werden scheinbar nur fächerartige Hyphen ausgebildet (Abb.: 3.28). Dies ist nicht vom Genotypen und auch nicht vom Probennahmezeitpunkt im Jahr abhängig.

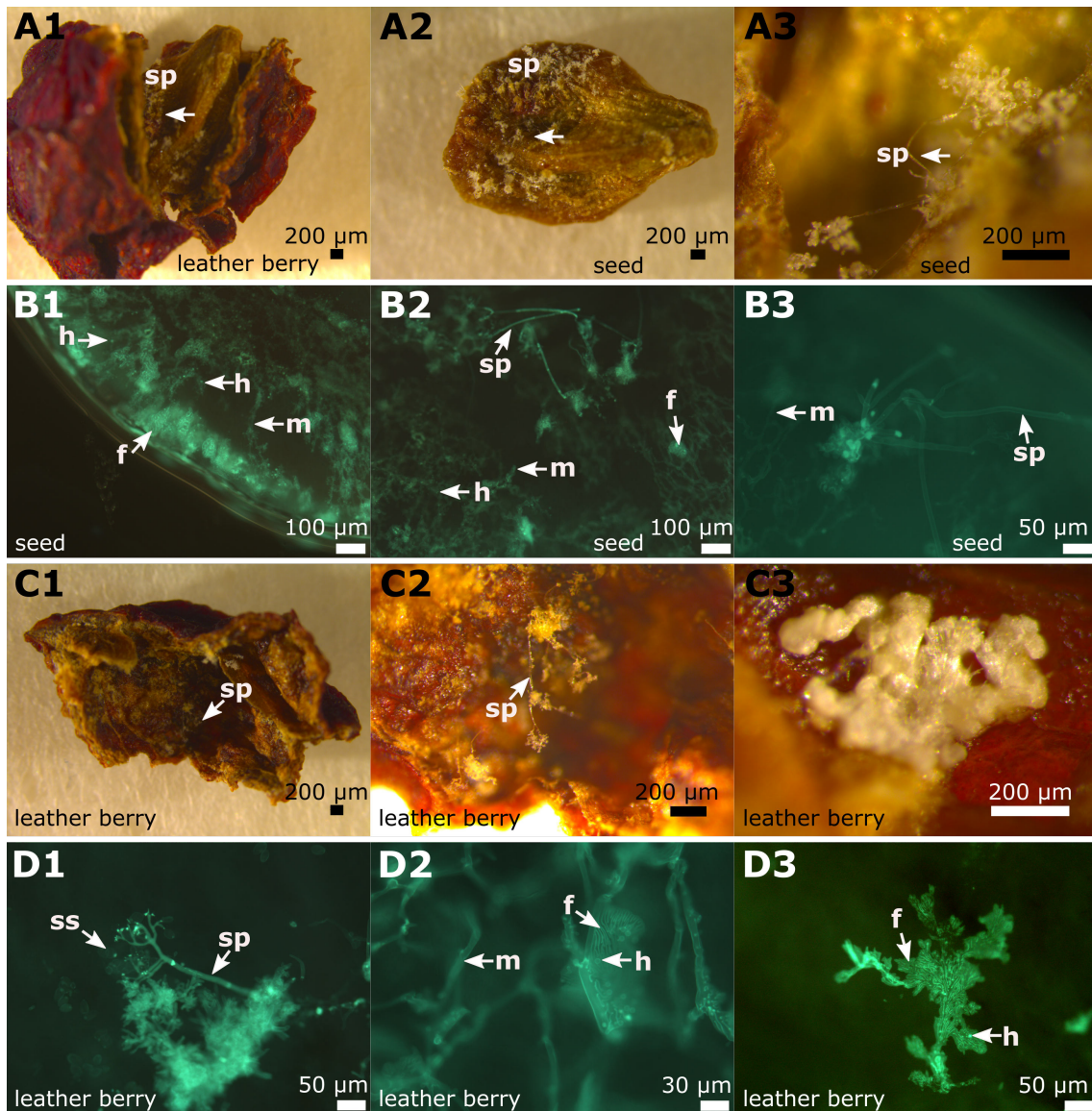


Abbildung 3.27: Übersicht von spät infizierten Beeren und deren Samen an 'Pinot blanc'. (A) Lederbeere und deren mitinfizierter Samen. (A2-3) Befallender Samen mit starken Sporangioophorenrasen. (B) Querschnitt des befallenen Samens. (C) Innenansicht der Lederbeerenhaut. (D) Mikroskopische Aufnahmen der Innenhaut der Lederbeere (Fröbel and Zyprian, 2019). m Myzelium, f fächerartige Hyphe, sp Sporangioophore, h Haustorien, ss Sporangien.

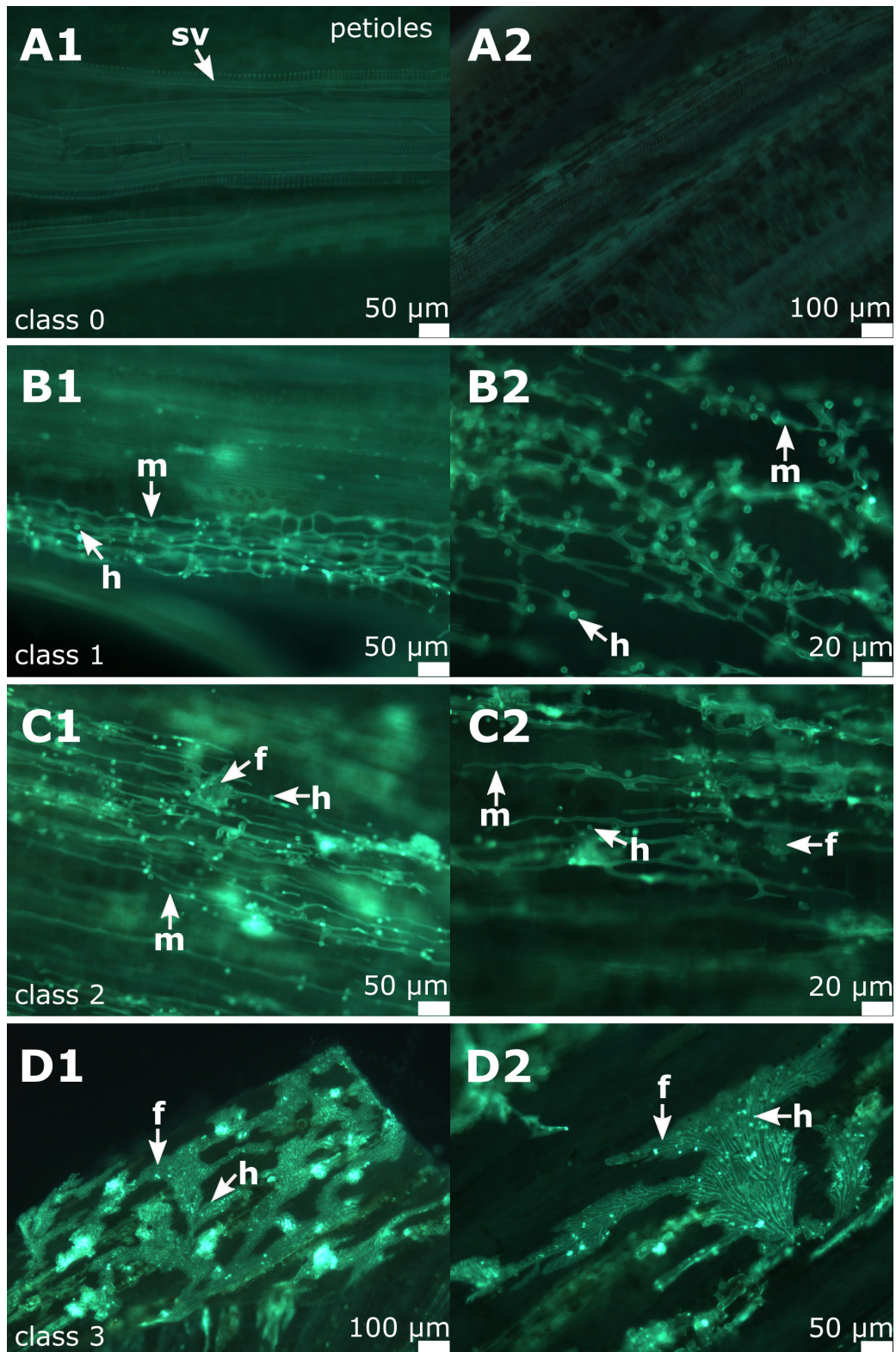


Abbildung 3.28: Untersuchung der Kolonisierung von Blattstielen in 'Pinot noir'. (A) keine Infektion, (B) Infektion ohne die Ausbildung von fächerartigen Hyphen, (C) Infektion unter Ausbildung von fächerartigen Hyphen, (D) Infektion unter Ausbildung von fast ausschließlich fächerartige Hyphen (Fröbel and Zyprian, 2019). m Myzelium, f fächerartige Hyphe, sv Spiralgefäße, h Haustorien.

3.6 Stilben-Analyse

Die Methode der Stilben-Analyse wurde zunächst validiert. Hierfür wurden verschiedene Tests durchgeführt. Zu Beginn wurde getestet, welches Probenmaterial am besten für die Stilbenbestimmung geeignet ist. Dafür wurden Topfpflanzen, Blätter und Blattscheiben unter gleichen Bedingungen inokuliert und inkubiert. Es wurde weiterhin getestet, welche Art der Inokulation mit *P. viticola* am besten geeignet ist. Unterschieden wurde hierbei zwischen Tropf- und Spray-Inokulation. Nach den Validationstestläufen zeigte sich, dass die Tropf-Inokulation auf Blattscheiben die stabilsten und sichersten Ergebnisse liefert. Deshalb wurden für die Probenläufe Blattscheiben mittels Tropf-Inokulation in Klimaschränken inkubiert.

Für die Positivkontrolle wurden Tests über die unterschiedliche Länge der UV-C-Bestrahlungszeit und verschiedene Inkubationsbedingungen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Bestrahlungsdauer (UV-C-Strahlung $\lambda = 254$ nm) von 20 Minuten einen stabilen Nachweis der Signale liefert und eine Inkubation bei 24°C in Dunkelheit das Signal der sechs Testsubstanzen weiterhin erhöht. Da die Positivkontrolle ein sicheres Positivergebnis liefern soll, wurden deshalb diese Bedingungen angewandt.

Die Zeitpunkte zur Bestimmung der Stilbenkonzentration stammen aus der Publikation von Pezet et al. (2004). Der dort letzt beschriebende Zeitpunkt von 96 hpi wurde nicht berücksichtigt, da es hier bereits wieder zum Abfall der Stilbenkonzentration kommt.

3.6.1 Stilben-Analysen an verschiedenen *Rpv*-Trägern

Als Positivkontrolle wurden Proben jedes Genotypen mit UV-C ($\lambda = 254$ nm) bestrahlt und nach 72 Stunden der Gehalt an Stilbenen gemessen. Für die Negativkontrollen wurden Proben jedes Genotypen mit sterilem Wasser kultiviert und zu jedem Zeitpunkt (ausgenommen 0 hpi) mit bestimmt. Diese Genotypen finden sich analog in den mikroskopischen Infektionsstudien wieder. Die Ergebnisse wurden durch zwei technische Wiederholungen bestätigt und mit drei biologischen Wiederholungen durchgeführt. In Tabelle 3.18 sind die Konzentrationen der Substanzen (nmol/g) angegeben.

Tabelle 3.17: Teil 1: Konzentration der detektierten Substanzen der Stilbene. Die letzten vier hervorgehobenen Substanzen besitzen eine hoch-fungizide Wirkung. Den mitgeführten Positivkontrollen wurde die Silbe Pos.- vorangestellt.

Genotyp	Stunden nach Inokulation [hpi]	Astringin C[$\mu\text{mol/g}$]	Piceid C[$\mu\text{mol/g}$]	Piceatannol C[$\mu\text{mol/g}$]	Resveratrol C[$\mu\text{mol/g}$]	ϵ -Viniferin C[$\mu\text{mol/g}$]	δ -Viniferin C[$\mu\text{mol/g}$]	Pterostilben C[$\mu\text{mol/g}$]
	0		31,17					
'Gutedel'	24	16,85	156,51		159,12	10,44	15,03	
	48	32,35	244,05	133,77	179,38	9,33	13,18	
	72	45,63	384,17		191,77	8,78	4,10	
Pos.-'Gutedel'	72							
	0		25,28		29,72			
'Merzling'	24	21,88	278,64		139,11	19,86	31,40	36,96
	48	62,67	525,65		830,82	112,73	257,33	124,58
	72	93,14	816,74	254,24	3099,45	487,07	970,18	257,79
Pos.-'Merzling'	72	30,30	285,30		11,23	117,19	74,01	52,64
	0		57,40					
'Saphira'	24	15,15	127,46		124,90	8,48	6,89	
	48	39,17	426,40		712,56	108,19	46,65	
	72	76,32	678,36		1848,18	461,09	359,43	65,12
Pos.-'Saphira'	72	28,48	147,63		73,76		4,98	
	0		18,54					
'Rondo'	24	28,01	255,73		154,14	22,52	30,34	13,42
	48	84,05	629,56	179,44	1341,78	121,84	213,73	56,21
	72	149,86	1005,60	574,44	1192,47	261,70	426,78	103,86
Pos.-'Rondo'	72	26,38	214,38		55,25			
	0		13,91					
'Golubok'	24	79,95	456,51		46,76	22,66	41,70	33,29
	48	96,04	596,33	277,35	651,75	56,41	92,56	88,21
	72	52,64	135,35		196,76	127,60	201,24	137,61
Pos.-'Golubok'	72	132,71	807,09		80,42	13,80	8,80	54,87

Tabelle 3.18: Teil 2: Konzentration der detektierten Substanzen der Stilbene. Die letzten vier hervorgehobenen Substanzen besitzen eine hoch-fungizide Wirkung. Den mitgeführten Positivkontrollen wurde die Silbe Pos.- vorangestellt.

Genotyp	Stunden nach Inokulation [hpi]		Astringin		Piceid		Piceatanmol		Resveratrol		ϵ -Viniferin		δ -Viniferin		Pterostilben	
			C [nmol/g]		C [nmol/g]		C [nmol/g]	C [nmol/g]		C [nmol/g]		C [nmol/g]		C [nmol/g]		C [nmol/g]
'Sibera'	0		14,00		37,42											
	24		17,99		378,66			175,22		74,42		95,13		22,45		
	48		59,02		1254,16			1351,53		233,40		633,73				
	72		73,70		1187,00		145,11	1837,89		295,05		639,00		69,40		
	72		25,66		454,34			272,16		27,99		4,48				
'Solaris'	0		19,72		12,20											
	24		29,39		178,50		83,86	460,30		158,86		62,18				
	48		75,03		921,75		377,59	5112,88		966,81		1243,02				
	72		204,83		1553,74		867,27	14,613,28		3355,32		1570,07				
Pos.-'Solaris'	72		35,77		399,96		429,41		113,33		42,88					

In den Wasserkontrollen können zu allen Zeitpunkten (24 hpi, 48 hpi, 72 hpi) die Substanzen *trans*-Astringin und *trans*-Piceid nachgewiesen werden. Dabei wurden in 'Gutedel', 'Golubok' und 'Solaris' beide Substanzen nachgewiesen. In 'Merzling', 'Saphira' und 'Sibera' kann nur Piceid detektiert werden.

Betrachtet man die für *P. viticola* toxischen Substanzen, findet man in den resistenten Genotypen einen deutlichen Anstieg im Gegensatz zum anfälligen Referenzgenotypen. In den resistenten Genotypen nimmt die Konzentration an *trans*- δ -Viniferin stetig zu. Jeweils nach 72 hpi kann die höchste Konzentration detektiert werden. In 'Solaris' konnte mit Abstand die höchste Konzentration nachgewiesen werden. Im anfälligen 'Gutedel' bleibt die Konzentration nahezu gleich (Abb.: 3.29 oberster Plot).

Insgesamt höhere Konzentrationen konnten bei *trans*- ϵ -Viniferin nachgewiesen werden. Auch hier zeigt sich eine stetige Zunahme der Konzentration mit jedem Zeitpunkt. In 'Solaris' konnten die höchsten Konzentrationen detektiert werden. In 'Gutedel' wurden nur geringe Mengen der Substanz produziert (Abb.: 3.29 mittlerer Plot).

Die Konzentration an *trans*-Resveratrol nimmt in den resistenten Genotypen ebenfalls stetig zu. Jedoch ist der Anstieg der Konzentration in den *Rpv10*-Trägern am zweiten Tage am höchsten und nimmt dann wieder ab. Auch bei dieser Substanz konnte die höchste Konzentration in 'Solaris' nachgewiesen werden. Der anfällige Genotyp zeigt über alle drei Zeitpunkte nach der Inokulation eine annähernd gleiche Konzentration (Abb.: 3.29 unterer Plot).

Vor der Inokulation konnte keine der Substanzen in den verschiedenen Genotypen, anfällig wie auch resistent, nachgewiesen werden (Tab.: 3.18).

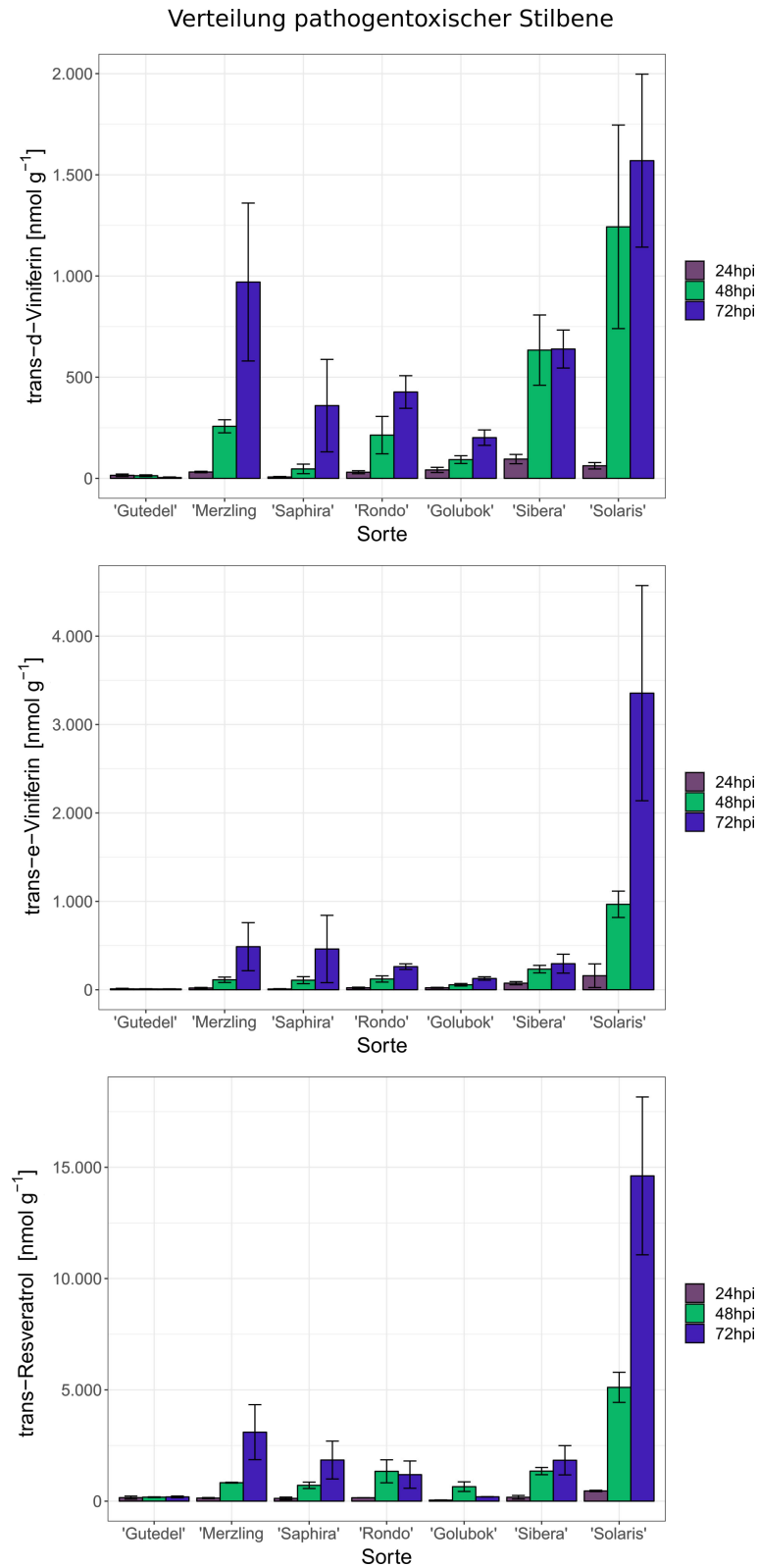


Abbildung 3.29: Darstellung der für *P. viticola* toxischen Substanzen im zeitlichen Verlauf innerhalb der verschiedenen Genotyen.

3.7 Transformation in anfällige *in vitro* Reben

Für die Transformation der Kandidatengene wurden die Konstrukte mittels Agrobakterien-T-DNA-Übertragung in embryogenes Material der anfälligen Sorten 'Chardonnay' und 'Riesling' eingebracht. Dabei zeigte sich, dass 'Chardonnay' durch schnellere Regeneration besser für diese Transformationsstudien geeignet ist. 'Riesling' dagegen bildet kaum regenerierendes sekundärembryonales Gewebe aus.

Existierten nach der Selektion regenerierte Reben, wurde pro Pflanze ein Blatt entfernt und aus diesem DNA extrahiert. Über PCR wurde mit einem genspezifischen und einem vektorspezifischen Primer die Korrektheit des Inserts (Kandidatengen) überprüft. Das Amplifikat wurde im Anschluss sequenziert, um das Ergebnis abzusichern.

Das regenerative Material unter Behandlung mit *Agrobakterien*-Stämmen mit beiden Konstrukten führte zur Sekundärembryogenese (Abb. 3.30 A und B), wobei die Transformation mit dem Kandidatengen *Rpv10#2* besser und schneller verlief. So konnten bereits zu Beginn des Jahres 2019 zwei regenerierte 'Chardonnay' Transformanten mit diesem Kandidatengen sicher identifiziert werden (Abb. 3.30 C und Abb. 3.31). Transformierte Pflanzen mit dem Konstrukt des Kandidatengens *Rpv10#1*, starben nach der Sekundärembryogenese ab, so dass keine transgenen Pflanzen herangezogen werden konnten. Zum Ende der Testperiode stand nicht genug Material der transformierten Pflanzen (Konstrukt *Rpv10#2*) für eine funktionelle Untersuchung zur Verfügung. Die Pflanzen waren noch zu klein, da die Regenerationszeit bei Reben im Vergleich zu vielen anderen pflanzlichen Organismen länger ist.

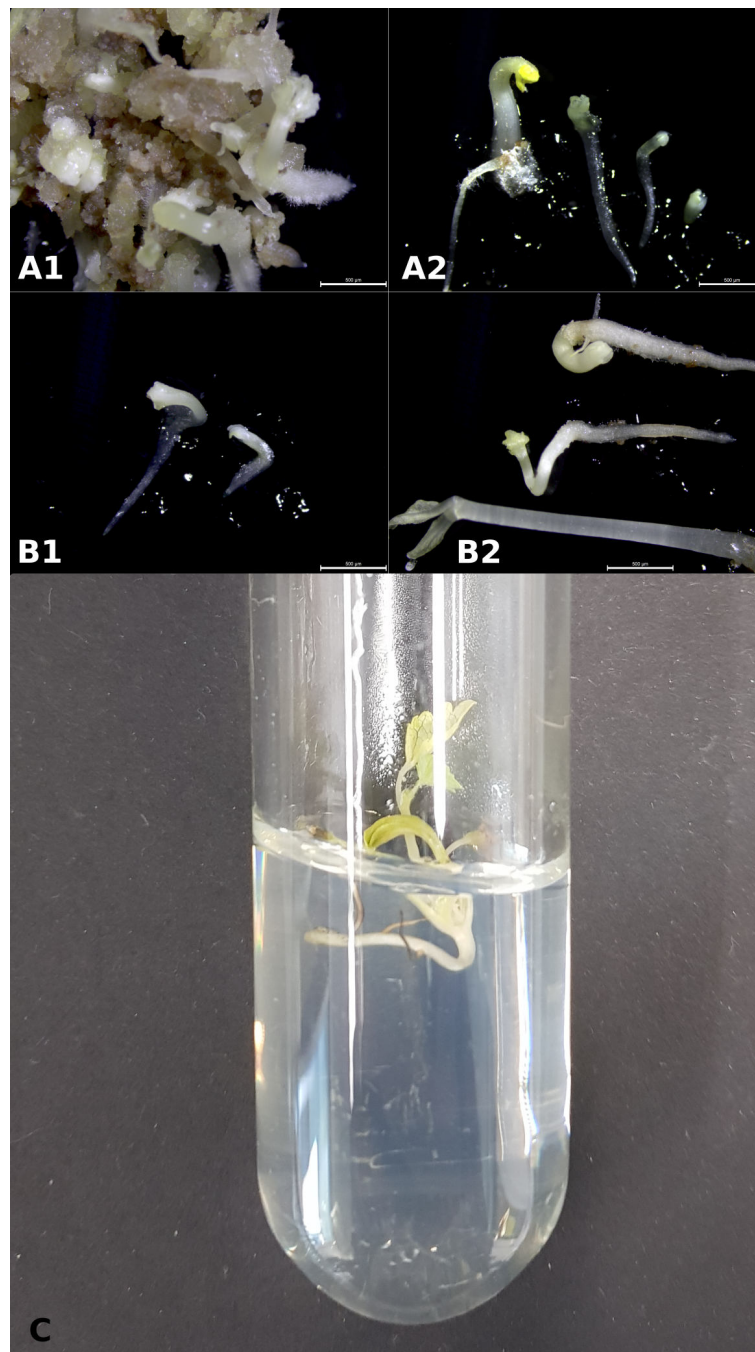


Abbildung 3.30: Regeneration der transformierten Reben mit den unterschiedlichen Kandidatengen. (**A1**) Transformierte anfällige 'Chardonnay'-Kalli gehen in die Sekundärembryogenese über. (**A2**) Die Pflanzenteile, die weiter regenerieren (sichtbar als kleiner „Keimling“), werden selektiert. In (**A**) handelt es sich um transformierten 'Chardonnay' mit dem Kandidatengen *Rpv10#2*. (**B**) zeigt die Sekundärembryogenese des transformierten 'Chardonnay' mit dem Kandidatengen *Rpv10#1*. (**C**) regenerierte 'Chardonnay'-Transformante mit dem Kandidatengen *Rpv10#2*.

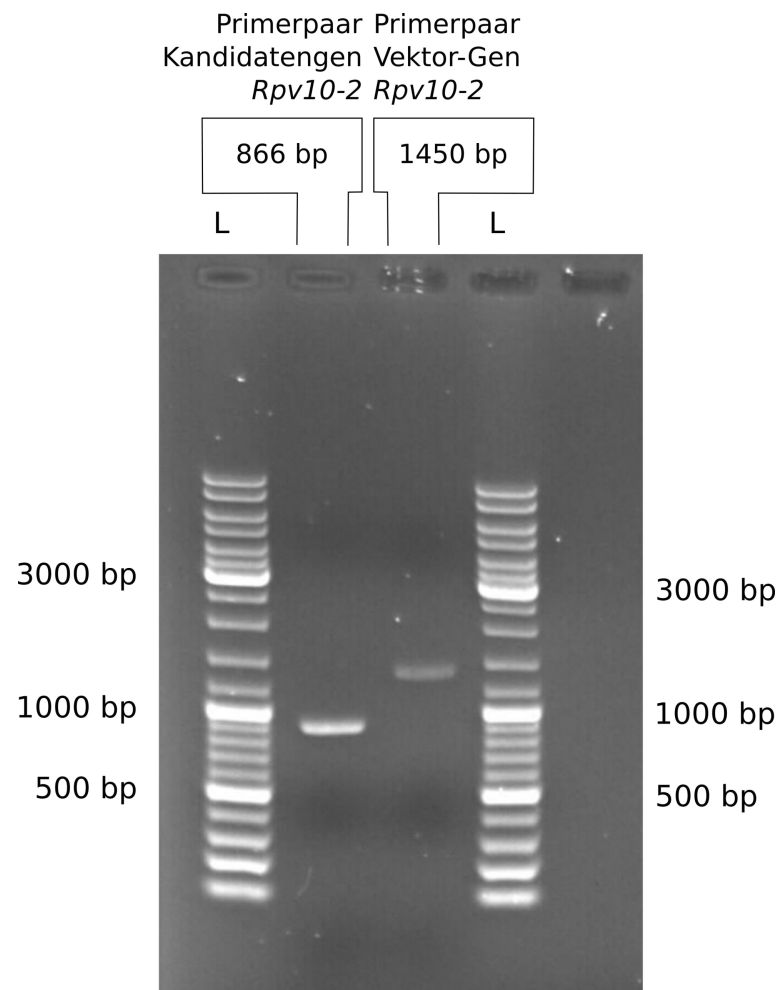


Abbildung 3.31: Die Amplifikate des Kandidatengens *Rpv10#2* aus einer Transformanten entsprechen dabei den erwarteten Größen.

4 Diskussion

Für die Aufklärung des Resistenzmechanismus des *Rpv10*-Lokus wurden verschiedene Methoden eingesetzt. Dabei kamen zum Einen bioinformatische und zum Anderen molekulare wie auch zytologische Analysen zum Einsatz.

Bei der Mehrzahl der bioinformatischen Tools handelt es sich um *in silico* Vorhersagen. Daher sind die Aussagen über die Promotorregion und darin sich befindende *cis*-Elemente sowie die Domänenstruktur der Kandidatengene Vorhersagen aus gut untersuchten Modellorganismen. Wobei Sequenzähnlichkeiten und -motive genutzt werden um diese auf den vorliegenden Organismus zu übertragen und daraus eine Angabe zur Lage bestimmter Regionen abzuleiten. Diese kann auf den Organismus angepasst sein, kann aber teilweise an verschiedenen Stellen abweichen. Die Aussagen einer *in silico* Berechnung liefern aus diesem Grund nicht in jedem Fall das reale Bild verschiedener sequenzieller Informationen. Die gewonnenen Anhaltspunkte sind jedoch von großer Wichtigkeit für alle nachstehenden molekularen Analysen. Sodass die Ergebnisse der Vorhersagen über die verschiedenen Regionen (Domänenstruktur, Promotorregion mit *cis*-Elementen) zu den beiden Kandidatengen nicht in allen Aussagen genau diesem Bild entspricht. So sind die Ergebnisse dieser Tools stark von den gewählten Einstellungen des Nutzers abhängig.

Die Ergebnisse zu den Kandidatengen aus den RNA-Seq-Analysen im Vergleich mit dem „Large gap read mapping“ kann leicht veränderte Aussagen liefern, da bei der RNA-Seq-Analyse das *Vitis*-Referenzgenom verwendet wird. Für die Berechnung des „Large gap read mapping“ wurden die beiden sequenzierten *Rpv10*-Regionen verwendet. Durch eine andere Sequenzinformation (vorhandene SNPs, Indels) innerhalb der BAC-Klon Sequenz, kann so ein abweichendes Ergebnis in der Vorhersage von z.B. Genregionen oder Transkripten vorliegen.

Auch in den praktisch durchgeführten Analysen existieren variable Parameter zum Erhalt der Ergebnisse. Bei allen Analysen mit Versuchspflanzen sollte der Zustand der Pflanze beachtet werden. Befindet sich die Versuchspflanze in einer Stresssituation, etwa durch Hitze, Trockenheit oder Befall durch Fraßschädlinge, kann es zu anderen Reaktionen der Pflanze kommen. Auch die Jahreszeit spielt bei den Versuchspflanzen sowie beim Pathogen eine große Rolle. Später im Jahr durchgeführte Versuche können dabei z.B. einen längeren Wachstumszyklus auf dem Wirt bedeuten oder andere Reaktionen auslösen.

4.1 Elektronentransport und Metabolite - Erste Instanz der Pathogenabwehr

Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass der Prozess zur Abwehr von Pathogenen in mehreren Phasen abläuft (Somssich and Hahlbrock, 1998; Morkunas and Ratajczak, 2014; Nishimura and Dangl, 2010; Jones and Dangl, 2006). Welche Einwirkungen durch Pathogene auf die Wirtspflanze welche Prozesse auslösen und welche Prozesse zusammenhängen und sich gegenseitig

auslösen, ist noch nicht vollkommen geklärt. Es existieren viele Annahmen darüber, wie der gesamte Abwehrprozess ablaufen kann (Katagiri and Tsuda, 2010). Einzelne Studien helfen dabei, die verschiedenen Schritte genauer zu verstehen.

4.1.1 RNA-Seq-Analyse

Durch die mikroskopischen Studien konnte gezeigt werden, dass in den frühen Phasen (6 hpi) bei der Besiedelung verschiedener *Vitis*-Sorten (anfällige und resistente mit verschiedenen Loki) noch kein direkter Kontakt zwischen dem Pathogen und den pflanzlichen Zellen besteht. Erst später konnte die Ausbildung von Haustorien beobachtet werden. Trotzdem konnte durch die RNA-Seq-Studien gezeigt werden, dass bereits nach 6 hpi Unterschiede in der Regulation verschiedener Gene in unterschiedlichen Genotypen bestehen. Eine große Rolle scheinen dabei die „biologischen Prozesse“ zu spielen, da hier zu diesem Zeitpunkt der Abwehr die meisten Gene induziert werden. Die Anzahl an induzierten Genen der beiden resistenten Genotypen sind dabei mit Abstand höher als im Vergleich zum anfälligen Referenzgenotypen. Den drei verschiedenen Unterklassen („Signaling“, „Defense response“, „Receptor“) innerhalb der „biologischen Prozesse“ können viele interessante Informationen zu den aktivierten Prozessen entnommen werden, die später durch weitere Versuche bestätigt werden konnten.

Zudem konnten innerhalb der Studien viele hochregulierte Gene gefunden werden, welche für Transkriptionsfaktoren (z.B. WRKY) kodieren, obwohl es zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Zellschädigung durch das Pathogen gekommen ist. Andere Studien bestätigen die gehäufte Induktion von Transkriptionsfaktoren, wobei die RNA-Seq-Analysen hier sehr viel später (frühestens nach 2 dpi) durchgeführt wurden (Siciliano et al., 2007; Mosquera et al., 2009; Maleck et al., 2000; Kawahara et al., 2012; Boddu et al., 2006). Diese Ergebnisse zeigen, dass bereits während des frühen Abwehrprozesses eine Aktivierung von bestimmten Transkriptionsfaktoren stattfindet, die später zu einer Expression von z.B. *R*-Genen führt (Singh et al., 2002; Rushton et al., 2010; Pandey and Somssich, 2009). Da es zu einer Aktivierung, die nicht durch Zellschädigung herbei geführt wurde kommt, kann es sein, dass diese TF durch Signale wie etwa einer Verschiebung des Elektrolythaushaltes oder Detektion molekularer Stoffe induziert werden. Eine große Rolle spielen hierbei Calciumionen. Es liegen große Unterschiede der Calciumionenkonzentration innerhalb und außerhalb der Pflanzenzellen vor. Erhöht sich die Konzentration an Calciumionen im Cytosol infolge einer Pathogenpenetration, wirkt sich dieser Effekt toxisch auf das angreifende Pathogen aus (Gabriel and Rolfe, 1990; Poschenrieder et al., 2013; Blumwald et al., 1998; Lecourieux et al., 2006).

Weiterhin wurde eine Aktivierung von Genen innerhalb der für den Pathogen-Abwehr-Prozess wichtigen Cluster (*PAL*, *STS*) beobachtet. Es konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden, dass die Induktion von Primärmetaboliten innerhalb der ersten sechs Stunden nach der Inokulation mit dem Pathogen stattfindet (Nicholson and Hammerschmidt, 1992). Dadurch kann hier ebenfalls eine frühe Erkennung des Pathogens beschrieben werden.

4.1.2 Regulation ausgewählter Transkriptionsfaktoren - qRT-PCR

In den RNA-Seq-Analysen konnte die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren beobachtet werden. Davon wurden die zwei Gene *WRKY75* und *ERF5* in einer Gen-Expressionsanalyse

überprüft. In der RNA-Seq-Studie zeigten sich diese beiden Gene nach 6 hpi bereits hochreguliert. Dieses Ergebnis konnte durch die Expressionsanalysen bestätigt werden und bestärkt damit die frühe Reaktion auf das eindringende Pathogen.

4.1.3 Nachweis der Induktion von *STS*-Genen

Im Rahmen der RNA-Seq-Analyse konnten zwei für den Abwehrprozess wichtige Cluster auf Chromosom 16 analysiert werden. Dabei zeigte sich ein Expressionsanstieg bereits nach 6 hpi in den Genen des *PAL*-Cluster (Primärmetabolite). Durch die Aktivierung der *PAL*-Gene konnte bereits eine starke Hochregulation von Genen des *STS*-Cluster (Sekundärmetabolite) beobachtet werden. Hierbei sind innerhalb der resistenten Genotypen weitaus mehr *STS*-Gene involviert, als im Fall des anfälligen Kontrollgenotypen. Verglichen mit den Stilben-Analysen mittels HPLC spiegeln sich diese Ergebnisse wieder. Einige Studien beschreiben den Zusammenhang der Aktivierung von Sekundärmetaboliten und der späteren Induktion von *R*-Genen (Rojas et al., 2014). Dieser Zusammenhang wurde durch die RNA-Seq-Studie bestätigt.

4.1.4 Stilben-Analyse mittels HPLC

Seit einiger Zeit sind die Stilbene als Sekundärmetaboliten und ihre Rolle innerhalb der Pathogenabwehr in einigen Pflanzen bekannt (Chong et al., 2009; Jeandet et al., 2010; Langcake and Pryce, 1977; Dixon, 2001). Die wichtigsten Vertreter sind dabei die pathogen-toxischen Substanzen *trans*-Resveratrol, *trans-ε*-Viniferin, *trans-δ*-Viniferin und Pterostilben. In der Stilben-Analyse wurden vor allem die ersten drei Vertreter betrachtet. Dabei zeigten sich klare Ergebnisse. Die anfällige Referenzsorte 'Gutedel' weist zu den analysierten Zeitpunkten keine (0 hpi) bis verschwindend geringe Konzentrationen während der Infektion mit dem Pathogen auf. Die resistenten Sorten zeigen einen deutlichen Anstieg dieser pathogen-toxisch wirkenden Substanzen. Von *trans-ε*-Viniferin reichen geringste Konzentrationen aus, um das Pathogen an der Besiedelung der Pflanze zu hindern (Pezet et al., 2003, 2004). Die höchsten Konzentrationen wurden nach 72 hpi detektiert. Dabei werden von *trans*-Resveratrol von allen Substanzen die höchsten Konzentrationen nachgewiesen. Nur geringe Menge *trans*-Resveratrol reichen, um das Wachstum des Myzels zu stoppen (Langcake and Pryce, 1976; Hoos and Blaich, 1990). Anhand der Analysen kann jedoch keine Einteilung in die unterschiedlichen *Rpv*-Träger erfolgen. Einen großen Einfluss hat die Sporenkonzentration bei der Inokulation. Trotz des Auszählens der Sporen vor Ansetzen des Assays sind gewisse Schwankungen nicht ausgeschlossen. Eine mit mehr Sporen gestartete Inokulation führt demzufolge auch zu einer höheren Zellschädigung wenn die Haustorien in die Zellen eingestülpt werden. Dadurch werden höhere Konzentrationen des Stoffe ins pflanzliche Gewebe lokal abgegeben und damit auch höhere Konzentrationen gemessen (Pezet et al., 2004; Langcake and McCarthy, 1979; Langcake and Pryce, 1976). Zudem handelt es sich um lokale Reaktionen, bei der die zu messenden Stoffe nur in unmittelbarer Umgebung des befallenen/beschädigten Gewebes detektiert werden können (Dercks et al., 1995; Bellow et al., 2012). Konzentrationsschwankungen können daher auch durch die Probennahme hervorgerufen werden.

Die Aktivierung von Stilbenen kann zum ersten Abwehrstadium gezählt werden, besitzt jedoch eine weitreichendere und stärkere Wirkung als zum Beispiel die Superoxide. Die Produkte der *PAL*, Phenylalanine, zählen zu den Primärmetaboliten der Pflanzen die im weiteren Verlauf der Signaltransduktion z. B. die Aktivierung der *STS*-Gene bewirken (Jeandet et al., 2010; Durner

and Klessig, 1999). Aus den Arbeiten von Nicholson and Hammerschmidt (1992) geht hervor, dass PAL eine sehr schnelle Interaktion mit pathogenen Elementen eingeht. Dabei konnte innerhalb der RNA-Seq-Studie ein Anstieg der Transkription von PAL nach 6 hpi beobachtet werden. Diese Aussagen decken sich mit den Ergebnissen aus den RNA-Seq-Analysen. Hier zeigte sich nach dieser Zeit bereits eine Induktion einiger dieser Gene und eine beginnende Hochregulation der STS-Gene. Die Detektion bestimmter Stilbene mittels HPLC kann jedoch auf Grund einer bestimmten Nachweisgrenze erst nach 24 hpi erfolgen.

4.1.5 Mikroskopie

Wie mikroskopisch analysiert findet innerhalb der ersten 6 hpi das Andocken der Zoosporen an den Stomata und das Penetrieren der Primärhyphae statt. Erst nach 24 hpi konnten Haustorien nachgewiesen werden. Der Erstkontakt mit dem Pathogen findet daher über PAMPs statt. Erst nach 24 Stunden kann man davon ausgehen, dass durch die Bildung von Haustorien, eine Rezeption über DAMPs stattfinden kann. Dabei kann es zu einer Verstärkung der Abwehrreaktion kommen, da durch eine Zellschädigung zusätzlich pathogenabwehrende Stoffe induziert werden (Tanaka et al., 2014). Beide Prozesse treten bei Pathogenbefall zusammen auf. Bei einem Befall mit *P. viticola* sind diese beiden Vorgänge jedoch leicht zeitlich voneinander getrennt. Durch die später eingeleitete DAMP werden die Superoxide gebildet, die im weiteren Verlauf den gleichen Signalweg der Abwehrreaktion einschlagen wie durch die Erkennung der MAMPs (Lotze et al., 2007). Durch die MAMPs werden im weiteren Verlauf der Abwehrreaktion *R*-Gene aktiviert. Zu welchem Zeitpunkt es zur Aktivierung dieser Gene kommt ist jedoch unklar. Man kann jedoch einen zeitlichen Rahmen angeben, in dem die Wirkung der MAMPs und DAMPs beginnt gegen das Pathogen zu arbeiten. Da bei den mikroskopischen Analysen eine Veränderung des Myzelwachstums nach 48 hpi festzustellen war, kann man davon ausgehen, dass die Abwehrantwort um diesen Zeitpunkt herum beginnt. Am fünften Tag sind auf den anfälligen Genotypen erste Sporangiothoren zu sehen die bei den *Rpv3.3* tragenden Genotypen am siebten Tag aus den Stomata austreten. Das Myzelwachstum verändert sich nach vier Tagen kaum. Demzufolge kann ein Maximum der pflanzlichen Immunantwort der *Rpv10*-Träger nach dem vierten Tag vermutet werden.

Bei der Auswertung der NBT-Färbeergebnisse zeigt sich in den Resistenzträgern ein stetiger Anstieg der nachgewiesenen Superoxide im inokulierten Bereich. Die Superoxide, die Teil einer sich aufbauenden HR sind, werden als erste Abwehrreaktion auf die Veränderung durch Pathogenbefall gebildet. Die Produktion erfolgt durch Elektronentransport in Chloroplasten und Mitochondrien sowie spezifischer Enzyme in anderen Zellkompartimenten (Baker and Orlandi, 1995; Mehdy, 1994). Vergleicht man die mikroskopischen Aufnahmen mit den makroskopischen, erkennt man den schrittweisen Aufbau der HR. Nach 24 hpi ist die Bildung von Sauerstoffradikalen mikroskopisch nachweisbar. Makroskopisch werden die zellulären Prozesse jedoch erst nach 48 - 72 hpi sichtbar. Hier kann man den frühesten Nachweis innerhalb der *Rpv10*-Träger nach 48 hpi sehen. Da diese Prozesse eine der ersten Reaktionen auf den Pathogenbefall darstellen, kann man ein mehrstufiges Abwehrsystem beschreiben, in welchem die Aktivierung von *R*-Genen im nachfolgenden Signalweg steht (McDowell and Dangel, 2000).

Der blaue Schein der in den resistenten Genotypen nach 24 hpi beobachtet werden konnte, zeigt die Anwesenheit von *trans*-Resveratrol (Dai et al., 1995). Dadurch lässt sich auch erklären, warum diese Erscheinung nur in den resistenten Genotypen beobachtet werden konnte. In der anfälligen Vergleichssorte wird nur, wenn überhaupt, wenig *trans*-Resveratrol gebildet. An Stomata wo es zur sichtbaren Bildung der Resveratrols kommt, konnten keine Hyphen des

Pathogens beobachtet werden. Wahrscheinlich kommt es hier direkt zu einer Eindämmung des Wachstums. Mit dieser Annahme lassen sich auch die Schwankungen innerhalb einer Stilben-Analyse erklären. Wird bei der Probennahme ein Bereich isoliert in dem sich weniger dieser stark Resveratrol-produzierenden Bereiche befinden, wird eine geringere Konzentration detektiert und umgekehrt.

4.2 Die Kandidatengene des *Rpv10*-Lokus - Zweite Instanz der Pathogenabwehr

Nachdem 2012 der *Rpv10*-Lokus am Geilweilerhof in der Kreuzungspopulation Gf.Ga-52-42 x 'Solaris' beschrieben worden war, konnte in den darauffolgenden Jahren die Sequenzierung der beiden Haplophasen aus 'Solaris' erfolgen. Durch das Wissen über die Sequenz-Unterschiede zwischen den Haplophasen konnten verschiedene bioinformatische Analysen wertvolle Hinweise zum Abwehrmechanismus liefern.

Die Gene des Resistenzlokus wurden mit Genhomologen verglichen, auf SNPs untersucht, Promotoranalysen durchgeführt und verschiedene Sequenzmotive ermittelt. Die beiden ausgewählten Kandidatengene *Rpv10#1* und *Rpv10#2* können bekannten und wichtigen Vertretern der pflanzlichen Abwehr zugeordnet werden.

4.2.1 Das Kandidatengen *Rpv10#1*

Das Kandidatengen *Rpv10#1* besitzt eine hohe Sequenzhomologie zu *RPS5*. Dabei handelt es sich um resistenzvermittelnde Gene der NLR-Familie. Die kodierten Proteine sind endomembran lokalisiert und werden durch die Anwesenheit von pathogeneigenen Elicitoren (*Avr*-Genen) aktiviert (Qi et al., 2012; Elmore et al., 2011). Sie bilden eine große Gruppe von *R*-Genen mit Unterschieden innerhalb der Domänen-Struktur der Proteine. Die NB-ARC-Domäne nimmt dabei den größten Teil der Domänen-Untereinheiten ein (Jupe et al., 2012; van der Biezen and Jones, 1998). Bei der *in silico* Vorhersage der Domänen-Struktur innerhalb der beiden Haplophasen des Gens *Rpv10#1* ist die NB-ARC-Domäne (828 nt) wesentlich länger als die LRR-Domäne (183 nt).

R-Gene werden durch Elicitoren des Pathogens aktiviert (Ramirez-Prado et al., 2018). Dabei spielt die LRR-Domäne eine entscheidende Rolle. Sie dient als Detektor der pathogeneigenen Effektoren (Van Der Biezen and Jones, 1998). Nach der Erkennung des Pathogeneffektors erfolgt die Signalweiterleitung zur NB-ARC-Domäne. Während dieses Prozesses kommt es zur Konformationsänderung des Proteins und damit zur Signalweiterleitung innerhalb der Abwehrkaskade (Takken and Goverse, 2012; Collier and Moffett, 2009; Takken et al., 2006). Aus diesem Grund führen Mutationen innerhalb dieser Domänen zum Verlust der Funktion durch das spezifische *R*-Gen (Tameling et al., 2006; Tornero et al., 2002; Tao et al., 2000; Dinesh-Kumar et al., 2000). In den bioinformatischen Analysen der beiden Haplophasen wurden sowohl in der NB-ARC- als auch in der LRR-Domäne eine Vielzahl von SNPs gefunden. Von den 24 SNPs in der NB-ARC-Domäne kommt es bei 17 Mutationen zu einem Austausch der Aminosäure zwischen den beiden Haplotypen. Davon ändert sich bei acht der Aminosäuren die chemische Eigenschaft der eingebauten Aminosäuren nach einem Austausch in der Nukleotidbase. Allein diese acht SNPs innerhalb der NB-ARC-Domäne würden ausreichen um die Funktionalität des Gens einzuschränken,

zu verändern oder sogar zu entwerten. Dabei kann zum Einen die Rezeption des Pathogens fehlschlagen oder die Interaktionsschnittstellen mit der LRR-Domäne verlieren ihre Funktion. In der LRR-Domäne befinden sich sieben SNPs von denen drei mit einer Änderung der chemischen Eigenschaft der Aminosäure einhergehen. Auch durch diese Mutationen in dem Bereich der Domäne kann in der anfälligen Variante eine Rezeption des Pathogens verändert oder verhindert werden. Dabei kann die nachfolgende Signalweiterleitung gestört sein oder abbrechen, da keine Interaktion mit der NB-ARC-Domäne mehr stattfindet.

Es konnten verschiedene Kinase-Motive in *Rpv10#1* gefunden werden. Hier wurde keine Mutation innerhalb des Motivs zwischen den beiden Haplotypen festgestellt. Das Motiv Kinase-1a und Kinase-2 wurde in beiden Haplotypen gefunden. Kinase-3a wurde nur im anfälligen Genotypen nachgewiesen. Kinase-1 dient der Bindung von Phosphat des Liganden, das Kinase-2 Motiv besitzt am Motivende die hoch konservierte Aminosäure Asparaginsäure, die für die Koordination des Metallions Magnesium am ATP verantwortlich ist. Das Kinase-3a Motiv dient der Bindung der Purinbase oder der Pentose (Traut, 1994). Allgemein ist bekannt, dass Kinasen eine zentrale Stellung innerhalb der Signaltransduktion während der Pathogenerkennung einnehmen (Romeis, 2001). Diese Kinase Motive können neben der NB-ARC-Domäne ebenfalls in der LRR-Domäne vorkommen und dort der Pathogenerkennung dienen. Dabei dienen diese Motive innerhalb eines *R*-Gens als eine Art unspezifischer Rezeptor (Gómez-Gómez and Boller, 2000; Afzal et al., 2008; DeYoung and Innes, 2006). In den Analysen konnten vier (resistenter Haplotyp) und fünf (anfälliger Haplotyp) Kinase Motive innerhalb der NB-ARC-Domäne gefunden werden. In der LRR-Domäne wurde keines von diesen Kinase Motiven gefunden. Da es noch eine Vielzahl unterschiedlicher Kinase Motive für die Erkennung von Pathogen gibt, heißt das nicht, dass sich innerhalb der LRR-Domäne keine Kinase Motive befinden.

Eine weiter untersuchte Gruppe von Sequenzmotiven bilden die NMPs. Sie zeigen verschiedene Sequenzmotive für Adenylat- und Guanylat-Kinasen. Sie dienen dem Gleichgewicht der katalytischen Reaktion zwischen ADP und ATP. Vor allem scheinen sie bei der Signalweiterleitung über Monophosphate eine zentrale Rolle einzunehmen, denn Monophosphate gelten als wichtige Signalmoleküle bei biotischem Stress (Meier et al., 2010). Hier konnten in der NB-ARC-Domäne sechs Motive innerhalb des resistenten und sieben innerhalb des anfälligen Haplotypen gefunden werden. Ein Sequenzmotiv befindet sich dabei in der LRR-Domäne. Nur in einem Motiv kommt es zu einem SNP. Dieses befindet sich nach der LRR-Domäne. Da es innerhalb dieser Sequenzmotive keine bis marginal kleine Unterschiede gibt, kann man davon ausgehen, dass der Unterschied von anfällig und resistent nicht durch diese Motive hervorgerufen wird.

Ein anderes Bild zeigt sich in der Analyse der LRR-Motive. In verschiedenen Studien wurde diskutiert, ob sich in der LRR-Domäne von *R*-Genen Motive befinden um pathogeneigene Elicitoren zu erkennen (Bent, 1996; Baker et al., 1997). In den Arbeiten von Warren et al. (1998) wurde gezeigt, dass es innerhalb der *R*-Gene verschiedene Motive gibt, die eine rezeptorähnliche Funktion ausüben. Mit verschiedenen LRR-Such-Motiven wurde der anfällige und resistente Haplotyp untersucht. Dabei konnten im gesamten *R*-Gen 20 Motive in den beiden Varianten gefunden werden. Innerhalb dieser Motive ergeben sich zwischen den beiden Haplotypen 17 SNPs. Einige der Motive zeigen dabei zwei bis drei Austausche. Vier der gefundenen Motive finden sich innerhalb der LRR-Domäne. Von diesen besitzen zwei einen SNP. Nach der LRR-Domäne befinden sich weitere zehn Motive außerhalb einer *in silico* vorhergesagten Domänenstruktur. Unter diesen befinden sich zwei Sequenzmotive mit jeweils einem Austausch, zwei Weitere mit zwei Austauschen und wieder zwei Weitere mit drei Austauschen. Aufgrund dieser hohen Dichte an Sequenzunterschieden innerhalb der Motive, könnte man von einer möglichen Veränderung der Pathogenrezeption ausgehen.

Bei den Promotor-Analysen des Kandidatengens *Rpv10#1* zeigte sich, dass der vorhergesag-

te Bereich wesentlich kürzer ist als in *Rpv10#2*. Innerhalb dieses Bereiches konnten 16 SNPs zwischen den beiden Haplotypen gefunden werden. Von großer Bedeutung könnte dabei eine Deletion von 6 bp im anfälligen Haplotypen innerhalb der TATA-Box sein, da der deletierte Bereich einer Bindestelle der RNA-Polymerase gleicht (Tracy and Stern, 1995). Bei Fehlen dieses Sequenzmotivs kann die RNA-Polymerase nicht mehr binden. Infolge dessen kann keine Transkription des nachfolgenden Gens gestartet werden. Auch andere kleinere Austausche in *cis*-regulatorischen Elementen können zu einer veränderten Genexpression führen (Savinkova et al., 2013; Wunsch et al., 2005; Cao-Lei et al., 2011). Hier bei kann zum Beispiel eine Funktionsveränderung, -einschränkung oder ein -verlust eintreten.

Nicht nur die Unterschiede in der Promotorregion zwischen den beiden Haplotypen können eine funktionelle Veränderung bewirken, die Austausche innerhalb des Gens des *Rpv10#1* allein können ebenfalls zu einer veränderten Transkription führen.

Aus der molekularen Charakterisierung des Kandidatengens geht hervor, dass in *Rpv10#1^s* die komplette LRR-Domäne entfällt. Damit ist deren rezeptorähnliche Funktion von pathogeneigenen Elicitoren zu detektieren nicht gegeben. Diese Tatsache kann Grund für den Unterschied zwischen dem anfälligen und dem resistenten Haplotypen sein. Bisher existieren verschiedene Meinungen zum Vorhandensein und der Relevanz der einzelnen Domänen innerhalb des *R*-Gens. Die Mehrheit der Studien sprechen von einem Funktionsverlust des *R*-Gens bei Fehlen der LRR-Domäne (Jones, 2001; Meyers et al., 2003; Eitas and Dangl, 2010; Caplan et al., 2008). Alternativmeinungen sehen Parallelen zu *R*-Genen in Tieren, bei denen die Präsenz der NB-ARC-Domäne für die Resistenzvermittlung und Funktionalität des Gens ausreichend ist (van der Biezen and Jones, 1998). Konkrete Studien existieren dazu jedoch noch nicht.

Wenn man annimmt, dass die Zusammenarbeit der beiden Domänen innerhalb der Pathogenerkennung eine wichtige Voraussetzung für die Funktionalität des Gens ist, ist das Ergebnis der molekularen Untersuchungen der Gensequenz ein wichtiger Hinweis auf den Unterschied zwischen anfällig und resistent (Rafiqi et al., 2009).

4.2.2 Das Kandidatengen *Rpv10#2*

Das Kandidatengen *Rpv10#2* gleicht dem Genhomolog *AP2/ERF* aus *A. thaliana*. Es handelt sich dabei um einen Transkriptionsfaktor, der sowohl eine Rolle bei abiotischen (Salz, Kälte, Trockenheit) als auch bei biotischen Stress spielt (Xu et al., 2011; Singh et al., 2002; Agarwal et al., 2006). Die Transkriptionsfaktoren die durch biotischen Stress aktiviert werden, besitzen eine *AP2*-Domäne und binden, bei Aktivierung durch Proteinkinasen, in Promotorregionen von Resistenzgenen und wirken im Nukleus (Licausi et al., 2013; Xu et al., 2011).

Durch die Suche von NLS kann eine *in silico* Vorhersage dieser Motive erfolgen. Für das Kandidatengen *Rpv10#2* konnte in der anfälligen wie auch in der resistenten Haplophase ein Kernimportsignal gefunden werden. Dadurch kann man annehmen, dass das Protein mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls in den Nukleus transportiert wird um seine Wirkung zu entfalten.

Durch den Vergleich der beiden Haplophasen und die Translation dieser Sequenzen, konnte eine silent-Mutation in der *AP2*-Domäne festgestellt werden. In verschiedenen Studien wird der Einfluss dieser Mutationen analysiert. Durch diese kann die Funktion des Genes geändert werden (Komar, 2007; Shastry, 2009). Kommt es wie im Fall des *Rpv10#2* zu einer Mutation in der *AP2*-Domäne, kann die DNA-binde-Aktivität des Gens verloren gehen (Okamoto et al., 1997). Geht diese verloren, kann eine Bindung an die Promotorregion der Zielgene nicht korrekt erfolgen. Ein verändertes Bindevverhalten des Transkriptionsfaktors in der Promotorregion von Resistenzgenen kann dazu führen, dass dessen Wirkung verändert wird oder ausbleibt. Ist dies

im Kandidatengen *Rpv10#2* der Fall, ist das ein wichtiges Indiz für den Unterschied zwischen einem anfälligen Genotypen und den resistenten *Rpv10*-Trägern.

Bei den Promotor-Analysen konnten für *Rpv10#2* 40 SNPs und fünf Indels identifiziert werden. Es gibt wenige Studien die sich mit dem Effekt von SNPs und Indels innerhalb der Promotor-region von Genen beschäftigen. Häufig ist nur die Sprache von einer veränderten Genexpression (Savinkova et al., 2013; Wunsch et al., 2005; Cao-Lei et al., 2011). Im Fall von *Rpv10#2* sind vor allem die Bereiche in denen sich *cis*-regulatorische Elemente befinden und es zu einem Austausch kommt, interessant. Diese stellen Bindemotive für eine große Anzahl an Molekülen dar. Können diese auf Grund eines veränderten Bindemotives nicht mehr binden, kann es zu verschiedenen Effekten führen (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2005; Benfey and Chua, 1990). Zum Beispiel könnte das nachfolgende Gen nicht oder nur unvollständig transkribiert werden. Damit ist die Genfunktion entweder nicht gegeben oder verändert. Vor allem das sieben Basenpaar große Indel in der TATA-Box des Kandidatengens kann einen Effekt auf die Wirksamkeit des Genes in anfälligen und resistenten *Rpv10* tragenden Genotypen haben. Wird der TF nicht aktiv, kann eine nachfolgende Abwehr nicht mehr stattfinden.

4.2.3 Die Kandidatengene in der RNA-Seq-Analyse

In der frühen Infektion (6 hpi) zeigen sich innerhalb der Kandidatengene keine aussagekräftigen Veränderungen zwischen den verschiedenen Genotypen. Bei *Rpv10#2* ist die Expression in allen drei Genotypen näherungsweise gleich und bei *Rpv10#1* findet im anfälligen Genotypen eine geringe Hochregulation des Gens statt. Wahrscheinlich ist, dass zu diesem Zeitpunkt eine Abwehr durch TF und *R*-Gene noch nicht eingeleitet wird und deshalb eine Induktion dieser Gene erst zu einem späteren Zeitpunkt stattfindet (Stotz et al., 2014). Das *R*-Gen nimmt eine Schlüsselrolle in der pflanzlichen Pathogenabwehr ein. Ob ein *R*-Gen involviert ist, zeigt sich makroskopisch durch eine HR (van der Biezen and Jones, 1998; Morel and Dangl, 1997; Coll et al., 2011). Wenn man davon ausgeht, dass *R*-Gene erst dann am Abwehrmechanismus beteiligt sind, wenn eine HR sichtbar ist, kann man nach den mikroskopischen Analysen eine Beteiligung dieser nach den ersten 48 hpi annehmen (Vleeshouwers et al., 2000). Es zeigt sich, je nach Genotyp und vorhandenem Resistenzloкус erst ab diesem Zeitpunkt eine beginnende Zelltod-Reaktion. Wann eine Beteiligung der *R*-Gene einsetzt, ist stark vom Pathogen abhängig. Dabei wird eine wichtige Rolle spielen, wann es zur Schädigung der Zellwand des Wirtes kommt. Man kann annehmen, dass Pathogene unter Bildung von Appressorien schneller die Induktion von *R*-Genen einleiten können. Pathogene wie *P. viticola* die zunächst zu den Stomata schwimmen und diese penetrieren, werden die Gene erst nach Ausbildung von Haustorien aktivieren können.

Auffällig in diesen Studien ist die starke Hochregulation des Aquaporin Proteins. Jedoch ist hier die Relevanz für eine Abwehrreaktion fragwürdig, da es sich um ein Wasserkanalprotein handelt (Kaldenhoff and Fischer, 2006; Chrispeels and Agre, 1994). Eine extreme Hochregulation wie in diesem Fall könnte durch die Testbedingungen einer Spay-Inokulation hervorgerufen worden sein (Maurel et al., 2009).

Nach der Auswertung aller Ergebnisse, scheint *Rpv10#1* das vielversprechendste Kandidatengen zu sein. So kann die Anfälligkeit von *Rpv10#1^s* mit einer fehlenden LRR-Domäne gut begründet werden. Weiterhin wird aus den mikroskopischen Studien klar, dass bei resistenten *Rpv10*

tragenden Sorten eine deutliche HR einsetzt, die nach den Studien von Shirasu and Schulze-Lefert (2000) und Hwang and Williamson (2003) auf eine Beteiligung von *R*-Genen der Familie NBS-LRR schließen.

4.3 Pathogenkolonisierung und Überwinterung

Neben dem Verständnis des Resistenzmechanismus *Rpv10* tragender Genotypen, war das Kolonisierungsverhalten von *P. viticola* innerhalb verschiedener *Vitis*-Sorten von Interesse. Aus einer Vielzahl von Studien ist bekannt, dass die Ausbreitung des Pathogens durch Blattadern eingedämmt wird und diese somit eine natürliche Barriere darstellen (Rumbolz et al., 2002; Burruano, 2000; Unger et al., 2007). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass durch die Ausbildung besonderer Strukturen (Fächer-Hyphen) die Überwindung der Blattadern erfolgen kann und dadurch eine Kolonisierung aller Pflanzenorgane möglich ist. In verschiedenen Versuchen zeigte sich, dass *P. viticola* zwischen den Zellen des Leitgewebes im Blattstängel und dem Pflanzensproß entlang wächst. Bekannt ist dieses Phänomen auch von anderen Pathogenen wie *B. cinerea*, oder als ein Vertreter der Oomyceten, *Peronospora rubi* (Williamson et al., 1995; McNicol et al., 1985; Bristow et al., 1986; Williamson et al., 2007). Durch diese Fähigkeit ist *P. viticola* in der Lage durch vegetatives Myzel in die neu gebildeten Knospen einzuwandern oder bei der Bildung dieser mit eingeschlossen zu werden.

Es wird in verschiedenen Studien diskutiert ob *P. viticola*, wie auch andere Reb-Pathogene, in Knospen überwintern kann (Rügner et al., 2002; Gadoury et al., 2012; Rumbolz and Gubler, 2005; Jacometti et al., 2010). Bisläng vermutete man, dass die im Herbst gebildeten Oosporen in der Erde oder in im Drahtrahmen hängengebliebenen Beeren überwintern (Cantoral et al., 2011). An im Frühjahr (März) untersuchten Knospen konnten geschlechtliche Fortpflanzungsorgane (weiblich wie männlich) des Pathogens an der Innenseite der Knospenschuppen beobachtet werden. Da sich diese pathogenen Strukturen erst zum dritten Versuchsmonat bilden kann man davon ausgehen, dass diese durch die milder werdenden Temperaturen (mehr als 10°C) aus den in den ersten beiden Versuchsmonaten beobachteten vegetativen Hyphen gebildet wurden. Nach dem Knospenbruch könnten diese neugebildeten Oosporen mit für die Erstinfektion im Jahr verantwortlich sein.

Um nachzuvollziehen, wie schnell die Ausbildung von Oosporen unter optimalen Bedingungen abläuft, wurden dafür Versuche an inokulierten Blättern durchgeführt. Schon bei Studien mit *Phytophthora infestans* ist die Bildung von sexuellen Fortpflanzungsorganen nach fünf bis sechs Tagen beschrieben. Zwei Tage später konnte die Bildung von Oosporen beobachtet werden (Drenth et al., 1995; Frinking et al., 1987). Bei den Studien mit *P. viticola* konnte eine zahlreiche Bildung von Oosporen nach sieben Tagen gezeigt werden. Wenn man davon ausgeht, dass die Ausbildung von sexuellen Fortpflanzungsorganen ein bis zwei Tage zuvor beginnt, kann es unter optimalen Bedingungen zu einer schnellen Bildung der Dauerform kommen. Dieses Experiment scheint zudem von der Jahreszeit abzuhängen, da die Bildung der Oosporen ausschließlich Ende Juli Anfang August beobachtet werden konnte (Meyer, 1975; Ayers and Lumsden, 1975; Ann and Ko, 1988; Wong et al., 2001). Wenn sich durch die Kolonisierung der Pflanze das Pathogen während der Wintermonate als vegetatives Myzel in den Knospen aufhält, kann es im Frühjahr bei wärmeren Temperaturen zu einer raschen Bildung sexueller Fortpflanzungsorgane und damit zur Ausbildung von Oosporen innerhalb der Knospen kommen. Nach dem Knospenbruch, bei ausreichender Blattnässe und milden Nachttemperaturen kann so ebenfalls eine Erstinfektion erfolgen.

5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Durch die verschiedenen Analysen in diesem Projekt, kann der *Rpv10*-Lokus besser verstanden werden. Durch die Auswahl differenter Genotypen mit verschiedenen Resistenzloki (*Rpv3.3*, *Rpv10*, *Rpv10/3.3*) konnte eine Reaktion auf das Pathogen spezifiziert werden. Durch diverse Färbemethoden und Mikroskopiertechniken konnte gezeigt werden, dass Träger des *Rpv10*-Lokus eine ähnlich starke HR wie *Rpv3.3*-Träger zeigen und diese verstärkt wird, wenn beide Resistenzloki kombiniert in einem Genotypen vorkommen. Die Infiltration des Pathogenmyzels im Mesophyll konnte durch die Anilin-Blau-Färbung mikroskopisch sichtbar gemacht und anschließend an verschiedenen Tagen (2 dpi, 7 dpi) graphisch durch die Software WinRhizo quantifiziert werden. Dabei bilden die Genotypen mit gleichen Resistenzloki eine Gruppe.

In einer RNA-Seq-Studie mit verschiedenen Genotypen (*Rpv10* homozygot, *Rpv10/Rpv3* heterozygot, anfällig) konnten eine Vielzahl induzierter Gene der frühen Abwehr gegen *P. viticola* analysiert und in unterschiedliche GO-Terme funktionell eingeteilt werden. Dabei bilden die „biologischen Prozesse“ die größte Untergruppe. In dieser wurden weitere Gruppen spezifiziert. Weiterhin konnten verschiedene induzierte Transkriptionsfaktoren gefunden werden, wovon im weiteren Verlauf stichpunktartig zwei über qRT-PCR getestet wurden. Durch die RNA-Seq-Studie konnten auf Chromosom 16 zwei Gen-Cluster beschrieben werden, die für den Abwehrprozess eine entscheidende Rolle spielen. Das *PAL*-Cluster nimmt dabei die erste Position innerhalb der Abwehr ein und aktiviert dabei das nachgeordnete zweite Cluster von Sekundärmetaboliten. Dieses *STS*-Cluster enthält zahlreiche *STS*-Gene, die bei einer Induktion zum Eindämmen oder Absterben des Pathogens führen. Dabei zeigte sich die größte Anzahl an hochregulierten Genen im heterozygoten Genotypen und die geringste Anzahl erwartungsgemäß im anfälligen.

Durch eine Stilben-Analyse mittels HPLC konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Es wurde zu vier verschiedenen Zeitpunkten (vor der Inokulation, 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi) der Gehalt von sieben Substanzen gemessen. In den resistenten Genotypen zeigte sich innerhalb der drei pathogentoxisch wirkenden Substanzen (*trans*-Resveratrol, *trans-ε*-Viniferin, *trans-δ*-Viniferin) ein stetiger Anstieg der Konzentrationen. Dabei wurden die höchsten Konzentrationen bei 'Solaris' detektiert. Diese eckt sich mit den Resultaten der RNA-Seq-Studie.

Für die spätere Abwehr konnten zwei Kandidatengene aus dem *Rpv10*-Lokus identifiziert werden. Dabei handelt es sich um *Rpv10#1* und *Rpv10#2*. Das Homolog zu *Rpv10#1* ist ein Resistenzgen aus *A. thaliana* und kann den NBS-LRR-Genen zugeordnet werden. Bei dem Homolog von *Rpv10#2* handelt es sich um den TF AP2/ERF, ebenfalls in *A. thaliana* charakterisiert. Beide Kandidatengene wurden mit verschiedenen bioinformatischen Analysen näher untersucht. Die Gene konnten im weiteren Verlauf amplifiziert, kloniert und in anfällige Reben transformiert werden. Die Funktion dieser Gene konnte in transgenen Pflanzen auf Grund langer Regenerationszeiten noch nicht analysiert werden.

Es zeigt sich aus den Studien, dass der *Rpv10*-Lokus einen starken Abwehreinfluss ausübt. Dieser wird durch das Vorhandensein anderer Resistenzloki verstärkt. Der Mechanismus kann durch das Zusammenspiel von verschiedenen aufeinanderfolgenden Einzelreaktionen beschrieben werden. Wobei die ersten eintretenden Reaktionen auf den Pathogenkontakt durch Superoxide ausgelöst werden, die sich zu einer HR aufbauen. Weiterhin werden im ersten Stadium pathogentoxische

Substanzen ausgeschüttet, die das Wachstum des Pathogens hemmen. Es handelt sich in diesem Fall nicht um eine Immunität bei der das Pathogen direkt nach der Penetration abgetötet, sondern langfristig inhibiert wird. Denn wie beobachtet werden konnte, verhalten sich die untersuchten Genotypen bis nach dem ersten Tag gleich. Die Zoosporen finden die Stomata, bilden eine Penetrationshyphne und beginnen mit der Infiltration des Mesophylls. Nach 24 hpi verändern sich jedoch diese Beobachtungen und die Genotypen zeigen ein unterschiedliches Verhalten auf das Pathogenwachstum. Im zweiten Stadium der Pathogenabwehr zeigt eines oder mehrere Gene aus dem *Rpv10*-Lokus den stärksten Einfluss auf den Abwehrprozess, denn wie bei den *Rpv3.3* tragenden Genotypen gezeigt werden konnte, bilden diese nach sieben Tagen ebenfalls Sporangien. Keiner der *Rpv10* tragenden Genotypen bildete während der Versuche Sporangien.

Für den weiteren Verlauf des Projektes könnten Genexpressionsstudien an den Kandidatengenen zu verschiedenen Zeitpunkten (24 hpi, 48hpi, 72 hpi, 4dpi, 7dpi) durchgeführt werden. Dabei könnte man den Zeitpunkt der Beteiligung der Kandidatengene beurteilen und einschätzen. An den transgenen Pflanzen könnten bei ausreichendem Material Stilben- wie auch mikroskopische Studien nach Testinokulation durchgeführt werden. Dadurch kann eine funktionelle Analyse der zwei gewählten Kandidatengene erfolgen. Da die Regeneration der Transformanten des Kandidatengens *Rpv10#1* unter seinem endogenen Promotor bisher nicht funktioniert hat, könnte man versuchen das Gen unter Kontrolle eines anderen Promotors zu einer Überexpression zu bringen. Für eine genauere Aufklärung des späteren Abwehrmechanismus wäre eine RNA-Seq-Analyse nach 72 hpi sinnvoll. Desweiteren sollte mittels einer CR-RT-PCR eine Analyse der Gensequenz des *Rpv10#1^r* erfolgen, um zu klären ob die *LRP*-Domäne in der Gensequenz des resistenten Haplotypen vorkommt.

6 Danksagungen

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben. Ein besonderer Dank gilt dabei:

Prof. Dr. Eva Zyprian für die Betreuung meiner Arbeiten zur Promotion sowie der Unterstützung bei fachlichen Fragestellungen und der Übernahme der Erstkorrektur.

Prof. Dr. Reinhard Töpfer für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit im Institut für Rebenzüchtung durchführen zu können.

Prof. Dr. Peter Nick für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Dr. Daniel Zendler für die Unterstützung bei der Umsetzung verschiedener Fragestellungen, fachlicher Diskussionen und projektbezogener Anregungen.

Dr. Florian Schwander und Ulrike Braun für die Unterstützung und Realisierung der Durchführung der Stilben-Analysen an der HPLC.

Dr. Margit Harst und dem gesamten *in vitro*-Team für die Transformationsarbeiten.

Dr. Oliver Trapp für die Beantwortung von Fragen rund ums Thema: "Welcher Genotyp, welche Resistenz-Loki."

Dr. Anna Schwandner, Nele Bendel, Ronja Schmitz, Rebecca Höfle und Florian Rist für die nötige Abwechslung auch neben der Arbeit.

Dr. Franco Röckel und Robert Richter für alle fachlichen Diskussionen und lustigen Momente auf Arbeit.

Stefan Lorenz für die Beantwortung mathematischer und statistischer Fragestellungen.

Margit Schneider als helfende Hand und Unterstützung im Labor.

dem Gartenbau-Team des IRZ für die Pflege der Gewächshauspflanzen.

dem Gartenbau-Team des OWS für die Pflege der Gewächshauspflanzen für die Versuche der Stilben-Analyse und Mikroskopie.

Claudia Welsch für die Bestellung des gewünschten Materials.

Ulla Müller für den EDV-Support.

Meinen Eltern Grit und Marcus Fröbel danke ich für die seelich-moralische Unterstützung trotz der vielen Kilometer zwischen uns, der Übernahme und dem Erledigen von Sachen die einfach einmal liegen geblieben sind, dem Lesen und Korrigieren meiner Arbeit und dem Zusammenhalt in dieser schwierigen Zeit. Meiner Oma Gisela Herold danke ich für ihr Vertrauen in mich über die gesamte Zeit und ihr gutes Zureden, ihre liebevolle Art sowie ihr Verständnis in anstrengenden Momenten. Meinem Opa Gerd Herold danke ich ebenso für sein Vertrauen in mich und seine aufbauende sowie inspirierende Art. Er war und wird stets mein größtes Vorbild bleiben.

Zum Schluss danke ich meinem Partner Alexander Eisold für sein Vertrauen, seine Motivation, seine unendliche Unterstützung, sein Verständnis, unseren Zusammenhalt seit vielen Jahren und seine Rückhalt während der Promotionsphase. Meinen Kindern Emil und Theo danke ich für die schöne und abwechslungsreiche Zeit neben der Arbeit.

Literaturverzeichnis

- AJ Afzal, AJ Wood, and DA Lightfoot. Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(5):507–517, 2008.
- PK Agarwal, P Agarwal, MK Reddy, and SK Sopory. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant cell reports*, 25(12):1263–1274, 2006.
- GN Agrios. Plant pathology. Fifth edition. *Ed Elsevier Academia Press. San Diego Calif. USA*, 2005.
- I Ahuja, R Kissen, and A M Bones. Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in plant science*, 17(2):73–90, 2012.
- K Ali, F Maltese, A Figueiredo, M Rex, AM Fortes, EM Zyprian, MS Pais, R Verpoorte, and YH Choi. Alterations in grapevine leaf metabolism upon inoculation with *Plasmopara viticola* in different time-points. *Plant science*, 191:100–107, 2012.
- G Alleweldt and JV Possingham. Progress in grapevine breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 75(5):669–673, 1988.
- SF Altschul, W Gish, W Miller, EW Myers, and DJ Lipman. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3):403–410, 1990.
- PJ Ann and WH Ko. Induction of oospore germination of *Phytophthora parasitica*. *Phytopathology*, 78(3):335–338, 1988.
- JJA Armenteros, KD Tsirigos, CK Sønderby, TN Petersen, O Winther, S Brunak, G von Heijne, and H Nielsen. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature biotechnology*, page 1, 2019.
- WA Ayers and RD Lumsden. Oospores of three *Pythium* species. *Phytopathology*, 65:1094–1100, 1975.
- KA Baggerly, L Deng, JS Morris, and CM Aldaz. Differential expression in SAGE: accounting for normal between-library variation. *Bioinformatics*, 19(12):1477–1483, 2003.
- B Baker, P Zambryski, B Staskawicz, and SP Dinesh-Kumar. Signaling in plant-microbe interactions. *Science*, 276(5313):726–733, 1997.
- CJ Baker and EW Orlandi. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual review of phytopathology*, 33(1):299–321, 1995.
- AA Bell. Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology*, 32(1):21–81, 1981.

- S Bellow, G Latouche, SC Brown, A Poutaraud, and ZG Cerovic. In vivo localization at the cellular level of stilbene fluorescence induced by *Plasmopara viticola* in grapevine leaves. *Journal of experimental botany*, 63(10):3697–3707, 2012.
- PN Benfey and NH Chua. The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science*, 250(4983):959–966, 1990.
- RN Bennett and RM Wallsgrove. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New phytologist*, 127(4):617–633, 1994.
- AF Bent. Plant disease resistance genes: Function meets structure. *The Plant Cell*, 8(10):1757, 1996.
- MJ Berkeley. Gardeners' Chronicle. *September*, 28(1850):612, 1847.
- B Berkelmann-Löhnertz, D Heibertshausen, O Baus-Reichel, U Hofmann, and R Kauer. Ohne Kupfer geht es nicht—Status quo im ökologischen Weinbau nach vier Jahren BÖL-Verbundprojekt. *Berichte aus dem Julius Kühn-Institut*, (142):17, 2010.
- M Bezhuashvili, L Tskhvedadze, M Surguladze, G Shoshiashvili, S Kharadze, L Gagunashvili, L Elanidze, and P Vashakidze. Stress-metabolites phytoalexins-stilbenoids of grape skin rkat-siteli variety (*Vitis vinifera* L.) in condition gray mildew. *Eurasian Journal of Biosciences*, 13(1):549–554, 2019.
- HC Birnboim and J Doly. Nucleic acid res., 7, 1513–1523. *CrossRef/ PubMed/ Web of Science*, 1979.
- P Bittel and S Robatzek. Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Current opinion in plant biology*, 10(4):335–341, 2007.
- E Blumwald, GS Aharon, and BCH Lam. Early signal transduction pathways in plant - pathogen interactions. *Trends in plant science*, 3(9):342–346, 1998.
- J Boddu, S Cho, WM Kruger, and GJ Muehlbauer. Transcriptome analysis of the barley - *Fusarium graminearum* interaction. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(4):407–417, 2006.
- RM Bostock, RA Laine, and JA Kuć. Factors affecting the elicitation of sesquiterpenoid phytoalexin accumulation by eicosapentaenoic and arachidonic acids in potato. *Plant Physiology*, 70(5):1417–1424, 1982.
- DJ Bradley, P Kjellbom, and CJ Lamb. Elicitor-and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell*, 70(1):21–30, 1992.
- PR Bristow, RJ McNicol, and B Williamson. Infection of strawberry flowers by *Botrytis cinerea* and its relevance to grey mould development. *Annals of Applied Biology*, 109(3):545–554, 1986.
- S Burruano. The life-cycle of *Plasmopara viticola*, cause of downy mildew of vine. *Mycologist*, 14(4):179–182, 2000.
- C Campbell. *Phylloxera: how wine was saved for the world*. HarperCollins Publishers, 2004.

- A Canaguier, J Grimplet, G Di Gaspero, S Scalabrin, E Duchêne, N Choisine, N Mohellibi, C Guichard, S Rombauts, and I Le Clainche. A new version of the grapevine reference genome assembly (12x. v2) and of its annotation (vcost. v3). *Genomics data*, 14:56, 2017.
- JM Cantoral, IG Collado, R González, JM Cantoral, and IG Collado. Filamentous fungi (*Botrytis cinerea*). *Molecular Wine Microbiology*, pages 257–277, 2011.
- L Cao-Lei, S Carlos Leija, R Kumsta, S Wüst, J Meyer, JD Turner, and CP Muller. Transcriptional control of the human glucocorticoid receptor: identification and analysis of alternative promoter regions. *Human genetics*, 129(5):533–543, 2011.
- J Caplan, M Padmanabhan, and SP Dinesh-Kumar. Plant NB-LRR immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming. *Cell host & microbe*, 3(3):126–135, 2008.
- ST Chisholm, G Coaker, B Day, and BJ Staskawicz. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124(4):803–814, 2006.
- J Chong, A Poutaraud, and P Huguency. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant science*, 177(3):143–155, 2009.
- MJ Chrispeels and P Agre. Aquaporins: water channel proteins of plant and animal cells. *Trends in biochemical sciences*, 19(10):421–425, 1994.
- NS Coll, P Epple, and JL Dangl. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell death and differentiation*, 18(8):1247, 2011.
- J Collier and R Parker. Eukaryotic mRNA decapping. *Annual review of biochemistry*, 73(1):861–890, 2004.
- SM Collier and P Moffett. NB-LRRs work a “bait and switch” on pathogens. *Trends in plant science*, 14(10):521–529, 2009.
- DEL Cooke, A Drenth, JM Duncan, G Wagels, and CM Brasier. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal genetics and biology*, 30(1):17–32, 2000.
- R Core Team. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2018.
- P Coutos-Thévenot, B Poinssot, A Bonomelli, H Yean, C Breda, D Buffard, R Esnault, R Hain, and M Boulay. In vitro tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst 1* gene under the control of a pathogen-inducible *PR 10* promoter. *Journal of Experimental Botany*, 52(358):901–910, 2001.
- GH Dai, C Andary, L Mondolot-Cosson, and D Boubals. Histochemical responses of leaves of in vitro plantlets of *Vitis* spp. to infection with *Plasmopara viticola*. *Phytopathology*, 85(2):149–154, 1995.
- JL Dangl, RA Dietrich, and MH Richberg. Death don’t have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *The Plant Cell*, 8(10):1793, 1996.
- A Deana, H Celesnik, and JG Belasco. The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5’ pyrophosphate removal. *Nature*, 451(7176):355, 2008.

- W Dercks, LL Creasy, and CJ Luczka-Bayles. *Stilbene phytoalexins and disease resistance in Vitis*. Marcel Dekker: New York, 1995.
- BJ DeYoung and RW Innes. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nature immunology*, 7(12):1243, 2006.
- SP Dinesh-Kumar, WH Tham, and BJ Baker. Structure–function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26):14789–14794, 2000.
- RA Dixon. Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411(6839):843, 2001.
- A Drenth, EM Janssen, and F Govers. Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. *Plant pathology*, 44(1):86–94, 1995.
- J Dudenhöffer. Molekulare Untersuchung von Resistenzen gegen den Falschen Mehltau der Weinrebe (*Plasmopara viticola*). *Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut*, 2:210, 2016.
- J Durner and DF Klessig. Nitric oxide as a signal in plants. *Current opinion in plant biology*, 2(5):369–374, 1999.
- J Ebel and D Scheel. Elicitor recognition and signal transduction. In *Genes involved in plant defense*, pages 183–205. Springer, 1992.
- J Ebel and D Scheel. Signals in host-parasite interactions. In *Plant Relationships*, pages 85–105. Springer, 1997.
- J Eder and EG Cosio. Elicitors of plant defense responses. In *International review of cytology*, volume 148, pages 1–36. Elsevier, 1994.
- R Eibach and R Töpfer. Progress in grapevine breeding. In *X International Conference on Grapevine Breeding and Genetics 1046*, pages 197–209, 2010.
- R Eibach, EM Zyprian, L Welter, and R Topfer. The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. *Vitis*, 46(3):120, 2007.
- R Eibach, R Toepfer, and L Hausmann. Use of genetic diversity for grapevine resistance breeding. *Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Früchteverwertung*, 60(3):332–337, 2010.
- TK Eitas and JL Dangl. NB-LRR proteins: pairs, pieces, perception, partners, and pathways. *Current opinion in plant biology*, 13(4):472–477, 2010.
- MA Ellis. Downy mildew of grape. *Ohio State University Extension Fact Sheet. HYG-3013-08*. http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/3000/pdf/HYG_3013_08.pdf, 2008.
- JM Elmore, ZJD Lin, and G Coaker. Plant NB-LRR signaling: upstreams and downstreams. *Current opinion in plant biology*, 14(4):365–371, 2011.
- K Enkerli, CW Mims, and MG Hahn. Ultrastructure of compatible and incompatible interactions of soybean roots infected with the plant pathogenic oomycete *Phytophthora sojae*. *Canadian Journal of Botany*, 75(9):1493–1508, 1997.

- Eurostat. The use of plant protection products in the European Union. 2007.
- S Fawke, M Doumane, and S Schornack. Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3):263–280, 2015.
- RB Ferreira, S Monteiro, R Freitas, CN Santos, Z Chen, LM Batista, J Duarte, A Borges, and AR Teixeira. Fungal pathogens: the battle for plant infection. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25(6):505–524, 2006.
- J Figueiredo, GJ Costa, M Maia, OS Paulo, R Malhó, M Sousa Silva, and A Figueiredo. Revisiting *Vitis vinifera* subtilase gene family: a possible role in grapevine resistance against *Plasmopara viticola*. *Frontiers in plant science*, 7:1783, 2016.
- BM Fischer, I Salakhutdinov, M Akkurt, R Eibach, KJ Edwards, R Töpfer, and EM Zyprian. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(3):501–515, 2004.
- HD Frinking, LC Davidse, and H Limburg. Oospore formation by *Phytophthora infestans* in host tissue after inoculation with isolates of opposite mating type found in the Netherlands. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 93(3):147, 1987.
- S Fröbel and EM Zyprian. Colonization of different grapevine tissues by *Plasmopara viticola*-a histological study. *Frontiers in Plant Science*, 10:951, 2019.
- S Fröbel, J Dudenhöffer, R Töpfer, and EM Zyprian. Transcriptome analysis of early downy mildew (*Plasmopara viticola*) defense in grapevines carrying the Asian resistance locus *Rpv10*. *Euphytica*, 215(2):28, 2019.
- J Gabaston, E Cantos-Villar, B Biais, P Waffo-Teguo, E Renouf, MF Corio-Costet, T Richard, and JM Mérillon. Stilbenes from *Vitis vinifera* L. waste: a sustainable tool for controlling *Plasmopara viticola*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(13):2711–2718, 2017.
- DW Gabriel and BG Rolfe. Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. *Annual review of phytopathology*, 28(1):365–391, 1990.
- DM Gadoury, L Cadle-Davidson, WF Wilcox, IB Dry, RC Seem, and MG Milgroom. Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. *Molecular plant pathology*, 13(1):1–16, 2012.
- DB Gammon and David H Evans. The 3'-to-5' exonuclease activity of vaccinia virus DNA polymerase is essential and plays a role in promoting virus genetic recombination. *Journal of virology*, 83(9):4236–4250, 2009.
- C Gessler, I Pertot, and M Perazzolli. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(1):3–44, 2011.
- S Godard, I Slacanin, O Viret, and K Gindro. Induction of defence mechanisms in grapevine leaves by emodin-and anthraquinone-rich plant extracts and their conferred resistance to downy mildew. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(9):827–837, 2009.

- V Göhre and S Robatzek. Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 46:189–215, 2008.
- L Gómez-Gómez and T Boller. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular cell*, 5(6):1003–1011, 2000.
- J Gorham, M Tori, and Y Asakawa. *The biochemistry of the stilbenoids*. Chapman & Hall, 1995.
- EM Govrin and A Levine. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current biology*, 10(13):751–757, 2000.
- JT Greenberg. Programmed cell death: a way of life for plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(22):12094–12097, 1996.
- F Grippi, L Crosta, G Aiello, M Tolomeo, F Oliveri, N Gebbia, and A Curione. Determination of stilbenes in sicilian pistachio by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD/FLD) and evaluation of eventually mycotoxin contamination. *Food chemistry*, 107(1):483–488, 2008.
- GJ Hageage and BJ Harrington. Use of calcofluor white in clinical mycology. *Laboratory Medicine*, 15(2):109–112, 2016.
- H Hajjeh, M Miazzi, and F Faretra. Overwintering of *Erysiphe necator* Schw. in southern Italy. *Journal of Plant Pathology*, pages 323–330, 2008.
- R Hammerschmidt. Rapid deposition of lignin in potato tuber tissue as a response to fungi non-pathogenic on potato. *Physiological Plant Pathology*, 24(1):33–42, 1984.
- R Hammerschmidt. Determination of natural and wound-induced potato tuber suberin phenolics by thioglycolic acid derivatization and cupric oxide oxidation. *Potato research*, 28(1):123–127, 1985.
- R Hammerschmidt, DTA Lamport, and EP Muldoon. Cell wall hydroxyproline enhancement and lignin deposition as an early event in the resistance of cucumber to *Cladosporium cucumerinum*. *Physiological plant pathology*, 24(1):43–47, 1984.
- KE Hammond-Kosack and JD Jones. Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, 8(10):1773, 1996.
- MC Heath. Evolution of resistance to fungal parasitism in natural ecosystems. *New Phytologist*, 119(3):331–343, 1991.
- MC Heath. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current opinion in plant biology*, 3(4):315–319, 2000.
- G Henry, P Thonart, and M Ongena. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *BASE*, 2012.
- K Higo, Y Ugawa, M Iwamoto, and T Korenaga. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic acids research*, 27(1):297–300, 1999.

- EE Hood, GL Helmer, RT Fraley, and MD Chilton. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *Journal of Bacteriology*, 168(3):1291–1301, 1986.
- ME Hood and HD Shew. Applications of KOH-aniline blue fluorescence in the study of plant-fungal interactions. *Phytopathology*, 86(7):704–708, 1996.
- G Hoos and R Blaich. Influence of resveratrol on germination of conidia and mycelial growth of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola*. *Journal of Phytopathology*, 129(2):102–110, 1990.
- CF Hwang and VM Williamson. Leucine-rich repeat-mediated intramolecular interactions in nematode recognition and cell death signaling by the tomato resistance protein Mi. *The Plant Journal*, 34(5):585–593, 2003.
- M Iriti, M Rossoni, M Borgo, and F Faoro. Benzothiadiazole enhances resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14):4406–4413, 2004.
- MA Jacometti, SD Wratten, and M Walter. Alternatives to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16(1):154–172, 2010.
- O Jaillon, JM Aury, B Noel, A Policriti, C Clepet, A Casagrande, N Choisne, S Aubourg, N Vitulo, and C Jubin. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *nature*, 449(7161):463, 2007.
- S Jain and A Kumar. The pathogenesis related class 10 proteins in plant defense against biotic and abiotic stresses. *Adv Plants Agric Res*, 3(1):00077, 2015.
- JL Jakobek and PB Lindgren. Generalized induction of defense responses in bean is not correlated with the induction of the hypersensitive reaction. *The Plant Cell*, 5(1):49–56, 1993.
- RC Jansen. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics*, 135(1):205–211, 1993.
- RC Jansen. Controlling the type i and type ii errors in mapping quantitative trait loci. *Genetics*, 138(3):871–881, 1994.
- RC Jansen and P Stam. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics*, 136(4):1447–1455, 1994.
- P Jeandet, B Delaunois, A Conreux, D Donnez, V Nuzzo, S Cordelier, C Clément, and E Courrot. Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants. *Biofactors*, 36(5):331–341, 2010.
- DA Jones and JDG Jones. The role of leucine-rich repeat proteins in plant defences. In *Advances in botanical research*, volume 24, pages 89–167. Elsevier, 1997.
- JDG Jones. Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Current opinion in plant biology*, 4(4):281–287, 2001.
- JDG Jones and JL Dangl. The plant immune system. *nature*, 444(7117):323, 2006.

- F Jupe, L Pritchard, GJ Etherington, K MacKenzie, PJA Cock, F Wright, SK Sharma, D Bolser, GJ Bryan, and JDG Jones. Identification and localisation of the NB-LRR gene family within the potato genome. *BMC genomics*, 13(1):75, 2012.
- G Jürges, H-H Kassemeyer, M Dürrenberger, M Düggelin, and P Nick. The mode of interaction between *Vitis* and *Plasmopara viticola* berk. & curt. ex de bary depends on the host species. *Plant Biology*, 11(6):886–898, 2009.
- R Kaldenhoff and M Fischer. Functional aquaporin diversity in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(8):1134–1141, 2006.
- S Kamoun. Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. *Current opinion in plant biology*, 4(4):295–300, 2001.
- H.-H. Kassemeyer, D. M. Gadourym, G. Hill, and W.F. Wilcox. Compendium of grape diseases, disorders, and pests. *Plant Biology*, second edition 2015:46–52, 2015.
- F Katagiri and K Tsuda. Understanding the plant immune system. *Molecular plant-microbe interactions*, 23(12):1531–1536, 2010.
- H Kauss. Role of the plasma membrane in host-pathogen interactions. In *The plant plasma membrane*, pages 320–350. Springer, 1989.
- H Kauss, W Jeblick, and A Domard. The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *catharanthus roseus*. *Planta*, 178(3):385–392, 1989.
- Y Kawahara, Y Oono, H Kanamori, T Matsumoto, T Itoh, and E Minami. Simultaneous RNA-seq analysis of a mixed transcriptome of rice and blast fungus interaction. *PloS one*, 7(11):e49423, 2012.
- O Keller, M Kollmar, M Stanke, and S Waack. A novel hybrid gene prediction method employing protein multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, 27(6):757–763, 2011.
- KV Kiselev, AS Dubrovina, and VP Bulgakov. Phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase gene expression in *rolB* transgenic cell cultures of *Vitis amurensis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 82(4):647–655, 2009.
- Y Kobayashi, M Yamada, I Kobayashi, and H Kunoh. Actin microfilaments are required for the expression of nonhost resistance in higher plants. *Plant and Cell Physiology*, 38(6):725–733, 1997.
- PE Kolattukudy. Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Annual review of phytopathology*, 23(1):223–250, 1985.
- AA Komar. Silent SNPs: impact on gene function and phenotype. 2007.
- M Komárek, E Čadková, V Chrástný, F Bordas, and JC Bollinger. Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environment international*, 36(1):138–151, 2010.
- A Kortekamp and EM Zyprian. Leaf hairs as a basic protective barrier against downy mildew of grape. *Journal of Phytopathology*, 147(7-8):453–459, 1999.

- A Kortekamp and EM Zyprian. Characterization of *Plasmopara*-Resistance in grapevine using *in vitro* plants. *Journal of plant physiology*, 160(11):1393–1400, 2003.
- S Kosugi, M Hasebe, N Matsumura, H Takashima, E Miyamoto-Sato, M Tomita, and H Yanagawa. Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin α . *Journal of Biological Chemistry*, 284(1):478–485, 2009.
- M. L. Kreuter. Pflanzenschutz im bio-garten. *BLV Buchverlag, München Wien Zürich*, page 249, 1990.
- J Kuhn and S Binder. RT-PCR analysis of 5 to 3-end-ligated mrnas identifies the extremities of cox2 transcripts in pea mitochondria. *Nucleic acids research*, 30(2):439–446, 2002.
- D Kumar, MA Yusuf, P Singh, M Sardar, and NB Sarin. Modulation of antioxidant machinery in α -tocopherol-enriched transgenic *Brassica juncea* plants tolerant to abiotic stress conditions. *Protoplasma*, 250(5):1079–1089, 2013.
- A La Torre, V Pompei, C Mandalà, and C Cioffi. Grapevine downy mildew control using reduced copper amounts in organic viticulture. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci*, 76:727–735, 2011.
- R Lafon and M Clerjeau. Downy mildew. compedium of grape diseases, 1988.
- C Lamb and RA Dixon. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual review of plant biology*, 48(1):251–275, 1997.
- R Lande and R Thompson. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics*, 124(3):743–756, 1990.
- ES Lander and D Botstein. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, 121(1):185–199, 1989.
- P Langcake and RJ Pryce. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the *Vitaceae* as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*, 9(1):77–86, 1976.
- P Langcake and RJ Pryce. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*, 33(2):151–152, 1977.
- PWVM Langcake and WV McCarthy. The relationship between resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis*, 18(3):244–253, 1979.
- D Lecourieux, R Ranjeva, and A Pugin. Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytologist*, 171(2):249–269, 2006.
- HA Lee and SI Yeom. Plant NB-LRR proteins: tightly regulated sensors in a complex manner. *Briefings in functional genomics*, 14(4):233–242, 2015.
- M Lescot, P Déhais, G Thijs, K Marchal, Y Moreau, Y Van de Peer, P Rouzé, and S Rombauts. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research*, 30(1):325–327, 2002.

- F Licausi, M Ohme-Takagi, and P Perata. APETALA 2/Ethylene responsive factor (AP 2/ERF) transcription factors: Mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytologist*, 199(3):639–649, 2013.
- KJ Livak and TD Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4):402–408, 2001.
- S Lloyd. Least squares quantization in PCM. *IEEE transactions on information theory*, 28(2):129–137, 1982.
- D.H. Lorenz, K.W. Eichhorn, H. Bleiholder, R. Klose, U. Meier, and E. Weber. Phaenologische Entwicklungsstadien der Weinrebe (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*). *Vitic. Enol. Sci.*, 49:66–70, 1994.
- MT Lotze, HJ Zeh, A Rubartelli, LJ Sparvero, AA Amoscato, NR Washburn, ME DeVera, X Liang, M Tör, and T Billiar. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunological reviews*, 220(1):60–81, 2007.
- M Luo, Y-H Wang, D Frisch, T Joobeur, RA Wing, and RA Dean. Melon bacterial artificial chromosome (bac) library construction using improved methods and identification of clones linked to the locus conferring resistance to melon Fusarium wilt (fom-2). *Genome*, 44(2):154–162, 2001.
- K Maleck, A Levine, T Eulgem, A Morgan, J Schmid, KA Lawton, JL Dangl, and RA Dietrich. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature genetics*, 26(4):403, 2000.
- C Maurel, V Santoni, DT Luu, MM Wudick, and L Verdoucq. The cellular dynamics of plant aquaporin expression and functions. *Current opinion in plant biology*, 12(6):690–698, 2009.
- JM McDowell and JL Dangl. Signal transduction in the plant immune response. *Trends in biochemical sciences*, 25(2):79–82, 2000.
- RJ McNicol, B Williamson, and A Dolan. Infection of red raspberry styles and carpels by *Botrytis cinerea* and its possible role in post-harvest grey mould. *Annals of Applied Biology*, 106(1):49–53, 1985.
- MC Mehdy. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant physiology*, 105(2):467, 1994.
- S Meier, O Ruzvidzo, M Morse, L Donaldson, L Kwezi, and C Gehring. The *Arabidopsis* wall associated kinase-like 10 gene encodes a functional guanylyl cyclase and is co-expressed with pathogen defense related genes. *PLoS one*, 5(1):e8904, 2010.
- J Messiaen, F Nérinckx, and P Van Cutsem. Callose synthesis in spirostanol treated carrot cells is not triggered by cytosolic calcium, cytosolic pH or membrane potential changes. *Plant and cell physiology*, 36(7):1213–1220, 1995.
- D Meyer. Studies on the germination of the oospores of *Phytophthora cactorum* (leb. et cohn) schroet. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 1975.

- BC Meyers, A Kozik, A Griego, H Kuang, and RW Michelmore. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 15(4):809–834, 2003.
- R Mittler. ROS are good. *Trends in plant science*, 22(1):11–19, 2017.
- HD Mohr and JV Herrmann. *Farbatlas Krankheiten, Schädlinge und Nützlinge an der Weinrebe*. Ulmer, 2005.
- JE Monheit, DF Cowan, and DG Moore. Rapid detection of fungi in tissues using calcofluor white and fluorescence microscopy. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 108(8):616–618, 1984.
- JB Morel and JL Dangl. The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell death and differentiation*, 4(8):671, 1997.
- I Morkunas and L Ratajczak. The role of sugar signaling in plant defense responses against fungal pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(7):1607–1619, 2014.
- T Moser. Untersuchung der transkriptionellen Regulation von Kandidatengenen der Pathogenabwehr gegen *Plasmopara viticola* in der Weinrebe. *Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut*, page 148, 2015.
- G Mosquera, MC Giraldo, CH Khang, S Coughlan, and B Valent. Interaction transcriptome analysis identifies *Magnaporthe oryzae* bas1-4 as biotrophy-associated secreted proteins in rice blast disease. *The Plant Cell*, 21(4):1273–1290, 2009.
- K Muller and H Sleumer. Biologische Untersuchungen über die Peronosporakrankheit des Weinstocks mit besonderer Berücksichtigung ihrer Bekämpfung nach Inkubationsmethode. *Z Wiss Landwirtschaft*, 79:509–576, 1934.
- S Myles, AR Boyko, CL Owens, PJ Brown, F Grassi, MK Aradhya, B Prins, A Reynolds, JM Chia, and D Ware. Genetic structure and domestication history of the grape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(9):3530–3535, 2011.
- KS Mysore and CM Ryu. Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in plant science*, 9(2):97–104, 2004.
- RL Nicholson and R Hammerschmidt. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual review of phytopathology*, 30(1):369–389, 1992.
- MT Nishimura and JL Dangl. *Arabidopsis* and the plant immune system. *The Plant Journal*, 61(6):1053–1066, 2010.
- T Nuernberger and V Lipka. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular plant pathology*, 6(3):335–345, 2005.
- SK Oh, S Lee, E Chung, JM Park, SH Yu, CM Ryu, and D Choi. Insight into Types i and ii nonhost resistance using expression patterns of defense-related genes in tobacco. *Planta*, 223(5):1101–1107, 2006.
- JK Okamoto, B Caster, R Villarroel, M Van Montagu, and KD Jofuku. The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(13):7076–7081, 1997.

- O Otte and W Barz. The elicitor-induced oxidative burst in cultured chickpea cells drives the rapid insolubilization of two cell wall structural proteins. *Planta*, 200(2):238–246, 1996.
- Q Pan, YS Liu, O Budai-Hadrian, M Sela, L Carmel-Goren, D Zamir, and R Fluhr. Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and *Arabidopsis*. *Genetics*, 155(1):309–322, 2000.
- SP Pandey and IE Somssich. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant physiology*, 150(4):1648–1655, 2009.
- W Pang, WT Crow, JE Luc, R McSorley, RM Giblin-Davis, KE Kenworthy, and JK Kruse. Comparison of water displacement and winrhizo software for plant root parameter assessment. *Plant Disease*, 95(10):1308–1310, 2011.
- JE Parker, W Schulte, K Hahlbrock, and D Scheel. An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea* elicits phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplasts. *Mol Plant Microbe Interact*, 4:19–27, 1991.
- M Peng and J Kuc. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology*, 82(6):696–699, 1992.
- E Peressotti, S Wiedemann-Merdinoglu, F Delmotte, D Bellin, G Di Gaspero, R Testolin, D Merdinoglu, and P Mestre. Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. *BMC Plant Biology*, 10(1):147, 2010.
- TN Petersen, S Brunak, G von Heijne, and H Nielsen. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods*, 8(10):785, 2011.
- R Pezet, Ca Perret, Julien B JD, K Tabacchi, Rand Gindro, and O Viret. δ -Viniferin, a resveratrol dehydrodimer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18):5488–5492, 2003.
- R Pezet, K Gindro, O Viret, and H Richter. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis*, 43(3):145–148, 2004.
- CMJ Pieterse, HA Leon Reyes, D Does, A Verhage, A Koornneef, JA van Pelt, and SCM van Wees. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *IOBC-WPRS Bulletin*, 83:77–80, 2012.
- A Pintye, Z Bereczky, GM Kovács, LG Nagy, X Xu, SE Legler, Z Váczy, KZ Váczy, T Caffi, and V Rossi. No indication of strict host associations in a widespread mycoparasite: grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) is attacked by phylogenetically distant *Ampelomyces* strains in the field. *Phytopathology*, 102(7):707–716, 2012.
- C Poschenrieder, C Cabot, S Martos, B Gallego, and J Barcelo. Do toxic ions induce hormesis in plants? *Plant science*, 212:15–25, 2013.
- HH Prell and P Day. *Plant-fungal pathogen interaction: a classical and molecular view*. Springer Science & Business Media, 2001.
- D Qi, BJ DeYoung, and RW Innes. Structure-function analysis of the coiled-coil and leucine-rich repeat domains of the rps5 disease resistance protein. *Plant physiology*, 158(4):1819–1832, 2012.

- M Rafiqi, M Bernoux, JG Ellis, and PN Dodds. In the trenches of plant pathogen recognition: Role of NB-LRR proteins. In *Seminars in cell & developmental biology*, volume 20, pages 1017–1024. Elsevier, 2009.
- N Raikhel. Nuclear targeting in plants. *Plant Physiology*, 100(4):1627, 1992.
- JS Ramirez-Prado, AA Abulfaraj, N Rayapuram, M Benhamed, and H Hirt. Plant immunity: from signaling to epigenetic control of defense. *Trends in plant science*, 23(9):833–844, 2018.
- J Richards, Q Liu, Ol Pellegrini, H Celesnik, S Yao, DH Bechhofer, C Condon, and JG Belasco. An RNA pyrophosphohydrolase triggers 5'-exonucleolytic degradation of mRNA in bacillus subtilis. *Molecular cell*, 43(6):940–949, 2011.
- CM Rojas, M Senthil-Kumar, V Tzin, and K Mysore. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontiers in plant science*, 5:17, 2014.
- T Romeis. Protein kinases in the plant defence response. *Current opinion in plant biology*, 4(5):407–414, 2001.
- V Rossi, T Caffi, and D Gobbin. Contribution of molecular studies to botanical epidemiology and disease modelling: grapevine downy mildew as a case-study. *European journal of plant pathology*, 135(4):641–654, 2013.
- A Rügner, J Rumbolz, B Huber, G Bleyer, U Gisi, H-H Kassemeyer, and R Guggenheim. Formation of overwintering structures of uncinula necator and colonization of grapevine under field conditions. *Plant pathology*, 51(3):322–330, 2002.
- J Rumbolz and WD Gubler. Susceptibility of grapevine buds to infection by powdery mildew *Erysiphe necator*. *Plant pathology*, 54(4):535–548, 2005.
- J Rumbolz, S Wirtz, H-H Kassemeyer, R Guggenheim, E Schäfer, and C Büche. Sporulation of *Plasmopara viticola*: differentiation and light regulation. *Plant Biology*, 4(03):413–422, 2002.
- PJ Rushton, IE Somssich, P Ringler, and QJ Shen. WRKY transcription factors. *Trends in plant science*, 15(5):247–258, 2010.
- L Savinkova, I Drachkova, T Arshinova, P Ponomarenko, M Ponomarenko, and N Kolchanov. An experimental verification of the predicted effects of promoter TATA-box polymorphisms associated with human diseases on interactions between the TATA boxes and TATA-binding protein. *PloS one*, 8(2):e54626, 2013.
- D Scheel. Oxidative burst and the role of reactive oxygen species in plant-pathogen interactions. *Oxidative Stress in Plants*.(Inzé D, Van Montagu M eds). *Taylor and Francis, London*, pages 137–153, 2002.
- S Schnee, O Viret, and K Gindro. Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(4-6):128–133, 2008.
- IMJ Scholtens-Toma, GJM De Wit, and PJGM De Wit. Characterization of elicitor activities of apoplastic fluids isolated from tomato lines infected with new races of *Cladosporium fulvum*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 95(1):161–168, 1989.

- F Schönbeck, HS Jülich, and EH Jülich. *Pflanzenkrankheiten*. Springer Fachmedien Wiesbaden, 1979.
- Gr Schruft, HH Kassemeyer, and Staatliches Weinbauinstitut Freiburg. *Krankheiten und Schädlinge der Weinrebe*. AgroConcept, 2013.
- F Schwander. Identifikation des Mehltäuresistenzlocus *Rpv10* für die Rebenzüchtung. *Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut*, 2012.
- F Schwander, R Eibach, I Fechter, L Hausmann, EM Zyprian, and R Töpfer. *Rpv10*: a new locus from the asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics*, 124(1):163–176, 2012.
- KM Sefc, I Pejić, E Maletić, MR Thomas, and F Lefort. Microsatellite markers for grapevine: tools for cultivar identification & pedigree reconstruction. In *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*, pages 565–596. Springer, 2009.
- M Sekhwal, P Li, I Lam, X Wang, S Cloutier, and F You. Disease resistance gene analogs (RGAs) in plants. *International journal of molecular sciences*, 16(8):19248–19290, 2015.
- JK Sharp, M McNeil, and P Albersheim. The primary structures of one elicitor-active and seven elicitor-inactive hexa (beta-D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea*. *Journal of Biological Chemistry*, 259(18):11321–11336, 1984.
- BS Shastry. SNPs: impact on gene function and phenotype. In *Single Nucleotide Polymorphisms*, pages 3–22. Springer, 2009.
- K Shirasu and P Schulze-Lefert. Regulators of cell death in disease resistance. In *Programmed Cell Death in Higher Plants*, pages 127–141. Springer, 2000.
- V Siciliano, A Genre, R Balestrini, G Cappellazzo, JGM Pierre, and P Bonfante. Transcriptome analysis of arbuscular mycorrhizal roots during development of the prepenetration apparatus. *Plant Physiology*, 144(3):1455–1466, 2007.
- Sigma-Aldrich. 18909 calcofluor white stain. *Sigma Product Information*, 2013(1):2, 1984.
- KB Singh, RC Foley, and L Oñate-Sánchez. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current opinion in plant biology*, 5(5):430–436, 2002.
- VV Solovyev, P Kosarev, I Seledsov, and D Vorobyev. Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. *Genome biology*, 7(1):S10, 2006.
- VV Solovyev, IA Shahmuradov, and AA Salamov. Identification of promoter regions and regulatory sites. In *Computational biology of transcription factor binding*, pages 57–83. Springer, 2010.
- IE Somssich and K Hahlbrock. Pathogen defence in plants—a paradigm of biological complexity. *Trends in plant Science*, 3(3):86–90, 1998.
- J Sperschneider, DM Gardiner, PN Dodds, F Tini, L Covarelli, KB Singh, JM Manners, and JM Taylor. Effectorp: predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning. *New Phytologist*, 210(2):743–761, 2016.

- J Sperschneider, PN Dodds, KB Singh, and JM Taylor. ApoplastP: prediction of effectors and plant proteins in the apoplast using machine learning. *New Phytologist*, 217(4):1764–1778, 2018.
- EB Speth, YN Lee, and SY He. Pathogen virulence factors as molecular probes of basic plant cellular functions. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(6):580–586, 2007.
- I Staatliches Weinbauinstitut Freiburg. Pflanzenschutz im Weinbau Antiresistenzstrategie bei Fungiziden. 2016.
- M Stanke, O Schöffmann, B Morgenstern, and S Waack. Gene prediction in eukaryotes with a generalized hidden markov model that uses hints from external sources. *BMC bioinformatics*, 7(1):62, 2006.
- M Stanke, M Diekhans, R Baertsch, and D Haussler. Using native and syntenically mapped cDNA alignments to improve de novo gene finding. *Bioinformatics*, 24(5):637–644, 2008.
- G Stecher, CW Huck, M Popp, and GK Bonn. Determination of flavonoids and stilbenes in red wine and related biological products by HPLC and HPLC–ESI–MS–MS. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 371(1):73–80, 2001.
- HU Stotz, GK Mitroussia, PJGM de Wit, and BDL Fitt. Effector-triggered defence against apoplastic fungal pathogens. *Trends in Plant Science*, 19(8):491–500, 2014.
- FLW Takken and A Goverse. How to build a pathogen detector: structural basis of NB-LRR function. *Current opinion in plant biology*, 15(4):375–384, 2012.
- FLW Takken, M Albrecht, and WIL Tameling. Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Current opinion in plant biology*, 9(4):383–390, 2006.
- WIL Tameling, JH Vossen, M Albrecht, T Lengauer, JA Berden, MA Haring, BJC Cornelissen, and FLW Takken. Mutations in the NB-ARC domain of I-2 that impair ATP hydrolysis cause autoactivation. *Plant physiology*, 140(4):1233–1245, 2006.
- K Tanaka, J Choi, Y Cao, and G Stacey. Extracellular ATP acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) signal in plants. *Frontiers in plant science*, 5:446, 2014.
- Y Tao, F Yuan, R T Leister, FM Ausubel, and F Katagiri. Mutational analysis of the *Arabidopsis* nucleotide binding site–leucine-rich repeat resistance gene *RPS2*. *The Plant Cell*, 12(12):2541–2554, 2000.
- MD Templeton and CJ Lamb. Elicitors and defence gene activation. *Plant, Cell & Environment*, 11(5):395–401, 1988.
- P This, T Lacombe, and MR Thomas. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *TRENDS in Genetics*, 22(9):511–519, 2006.
- H Thordal-Christensen. Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current opinion in plant biology*, 6(4):351–357, 2003.
- R Töpfer, L Hausmann, and R Eibach. Molecular breeding. *Genetics, genomics and breeding of grapes*. Science Publishers, Enfield, pages 160–185, 2011a.

- R Töpfer, L Hausmann, M Harst, E Maul, EM Zyprian, and R Eibach. New horizons for grapevine breeding. *Methods in temperate fruit breeding. fruit, vegetable and cereal science and biotechnology*, 5:79–100, 2011b.
- P Tornero, RA Chao, WN Luthin, SA Goff, and JL Dangl. Large-scale structure–function analysis of the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein. *The Plant Cell*, 14(2):435–450, 2002.
- MA Torres. ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum*, 138(4):414–429, 2010.
- MA Torres, JDG Jones, and JL Dangl. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant physiology*, 141(2):373–378, 2006.
- RL Tracy and DB Stern. Mitochondrial transcription initiation: promoter structures and RNA polymerases. *Current genetics*, 28(3):205–216, 1995.
- TW Traut. The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide-binding sites. In *EJB Reviews 1994*, pages 105–115. Springer, 1994.
- S Unger, C Büche, S Boso, and HH Kassemeyer. The course of colonization of two different *Vitis* genotypes by *Plasmopara viticola* indicates compatible and incompatible host-pathogen interactions. *Phytopathology*, 97(7):780–786, 2007.
- EA van der Biezen and JDG Jones. The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Current Biology*, 8(7):R226–R228, 1998.
- EA Van Der Biezen and JDG Jones. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in biochemical sciences*, 23(12):454–456, 1998.
- LC Van Loon and EA Van Strien. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and molecular plant pathology*, 55(2):85–97, 1999.
- LC van Loon, M Rep, and CMJ Pieterse. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44:135–162, 2006.
- A Vercesi, R Tornaghi, S Sant, S Burruano, and F Faoro. A cytological and ultrastructural study on the maturation and germination of oospores of *Plasmopara viticola* from overwintering vine leaves. *Mycological Research*, 103(2):193–202, 1999.
- S Vezzulli, M Troglio, G Coppola, A Jermakow, D Cartwright, A Zharkikh, M Stefanini, MS Grando, R Viola, and AF Adam-Blondon. A reference integrated map for cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.) from three crosses, based on 283 SSR and 501 SNP-based markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(4):499–511, 2008.
- S Vezzulli, G Malacarne, D Masuero, A Vecchione, C Dolzani, V Goremykin, ZH Mehari, E Banchi, R Velasco, and M Stefanini. The *Rpv3-3* haplotype and stilbenoid induction mediate downy mildew resistance in a grapevine interspecific population. *Frontiers in plant science*, 10:234, 2019.

- VGAA Vleeshouwers, W van Dooijeweert, F Govers, S Kamoun, and LT Colon. The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta*, 210(6):853–864, 2000.
- T Vogt. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant*, 3(1):2–20, 2010.
- MH Walter. Regulation of lignification in defense. In *Genes involved in plant defense*, pages 327–352. Springer, 1992.
- MB Wang and Q Zhang. Issues in using the winrhizo system to determine physical characteristics of plant fine roots. *Acta Ecologica Sinica*, 29(2):136–138, 2009.
- ZY Wang and Y Ge. *Agrobacterium*-mediated high efficiency transformation of tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Journal of Plant Physiology*, 162(1):103–113, 2005.
- RF Warren, A Henk, P Mowery, E Holub, and RW Innes. A mutation within the leucine-rich repeat domain of the *Arabidopsis* disease resistance gene *RPS5* partially suppresses multiple bacterial and downy mildew resistance genes. *The Plant Cell*, 10(9):1439–1452, 1998.
- LJ Welter, N Göktürk-Baydar, M Akkurt, E Maul, R Eibach, R Töpfer, and EM Zyprian. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Molecular Breeding*, 20(4):359–374, 2007.
- CA West. Fungal elicitors of the phytoalexin response in higher plants. *Naturwissenschaften*, 68(9):447–457, 1981.
- R Whetten and R Sederoff. Lignin biosynthesis. *The plant cell*, 7(7):1001, 1995.
- WF Wilcox, WD Gubler, and JK Uyemoto. *Compendium of grape diseases, disorders, and pests*. Am Phytopath Society, 2015.
- B Williamson, WA Breese, and RC Shattock. A histological study of downy mildew (*Peronospora rubi*) infection of leaves, flowers and developing fruits of Tummelberry and other *Rubus* spp. *Mycological Research*, 99(11):1311–1316, 1995.
- B Williamson, B Tudzynski, P Tudzynski, and JAL van Kan. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular plant pathology*, 8(5):561–580, 2007.
- FP Wong, HN Burr, and WF Wilcox. Heterothallism in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology*, 50(4):427–432, 2001.
- A Wunsch, Y Ahda, F Banaz-Yaşar, B Sonntag, E Nieschlag, M Simoni, and J Gromoll. Single-nucleotide polymorphisms in the promoter region influence the expression of the human follicle-stimulating hormone receptor. *Fertility and sterility*, 84(2):446–453, 2005.
- T Xiang, N Zong, Y Zou, Y Wu, J Zhang, W Xing, Y Li, X Tang, L Zhu, and J Chai. *Pseudomonas syringae* effector *AvrPto* blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Current biology*, 18(1):74–80, 2008.
- ZS Xu, M Chen, LC Li, and YZ Ma. Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement F. *Journal of integrative plant biology*, 53(7):570–585, 2011.

- K Yamaguchi-Shinozaki and K Shinozaki. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic-and cold-stress-responsive promoters. *Trends in plant science*, 10(2):88–94, 2005.
- L Yin, Y An, Ju Qu, Li, Y Zhang, I Dry, H Wu, and J Lu. Genome sequence of *Plasmopara viticola* and insight into the pathogenic mechanism. *Scientific reports*, 7:46553, 2017.
- Y Yu, Y Zhang, L Yin, and J Lu. The mode of host resistance to *Plasmopara viticola* infection of grapevines. *Phytopathology*, 102(11):1094–1101, 2012.
- H Zhao, H Zhao, J Wang, B Wang, and Y Wang. Stress stimulation induced resistance of plant. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 43(3-4):174–178, 2005.
- Y Zhou, M Massonnet, JS Sanjak, D Cantu, and BS Gaut. Evolutionary genomics of grape (*Vitis vinifera* ssp. *vinifera*) domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(44):11715–11720, 2017.
- C Zipfel. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current opinion in immunology*, 20(1):10–16, 2008.
- EM Zyprian and CI Kado. *Agrobacterium*-mediated plant transformation by novel mini-t vectors in conjunction with a high-copy vir region helper plasmid. *Plant molecular biology*, 15(2):245–256, 1990.

A Anhang

A.1 Tabellen

Table A.4: Teil 1: Organisation der GO-Sub-Terme in der GO-Term-Gruppe „Biologische Prozesse“.

„Signaling“	„Defense response“	„Receptor“
cellular response to calcium ion	callose deposition in cell wall	acropetal auxin transport
cellular response to hypoxia	defense response	amino acid import
cellular response to indolebutyric acid stimulus	defense response by callose deposition	amino acid transmembrane transport
cellular response to iron ion starvation	defense response to bacterium	ammonium transmembrane transport
cellular response to light intensity	defense response to fungus	basipetal auxin transport
cellular response to light stimulus	defense response to oomycetes	divalent metal ion transport
cellular response to phosphate starvation	negative regulation of defense response	drug transmembrane transport
cellular response to salt stress	oxidation-reduction process	electron transport chain
hyperosmotic salinity response	regulation of defense response	guanine transport
hypotonic salinity response	regulation of plant-type hypersensitive response	inorganic diphosphate transport
intracellular signal transduction	respiratory burst involved in defense response	iron ion transport
jasmonic acid mediated signaling pathway	response to biotic stimulus	lipid transport
negative regulation of abscisic acid mediated signaling pathway	response to gibberellin stimulus	membrane fusion
phosphorelay signal transduction system	response to jasmonic acid stimulus	metal ion transport
red light signaling pathway	response to nematode	myo-inositol transport
response to abiotic stimulus	response to other organism	nitrate transport
response to abscisic acid stimulus	response to oxidative stress	nucleotide transport

Tabelle A.5: Teil 2: Organisation der GO-Sub-Terme in der GO-Term-Gruppe „Biologische Prozesse“.

„Signaling“	„Defense response“	„Receptor“
response to absence of light	response to stress	phosphorelay signal transduction system
response to auxin stimulus	response to virus	photosynthetic electron transport in photosystem I
response to cadmium ion	response to wounding	plastid translation
response to desiccation		proline transport
response to endoplasmic reticulum stress		regulation of proton transport
response to far red light		regulation of translation
response to fructose stimulus		regulation of transport
response to high light intensity		single-organism transport
response to hormone stimulus		sulfate transport
response to hypoxia		transmembrane transport
response to karrikin		tripeptide transport
response to light intensity		vesicle-mediated transport
response to light stimulus		
response to misfolded protein		
response to molecule of bacterial origin		
response to ozone		
response to red light		
response to salt stress		
response to stimulus		
response to sucrose stimulus		
response to UV		
response to water deprivation		
small GTPase mediated signal transduction		
telomere maintenance in response to DNA damage		

Tabelle A.1: Teil 1: Eingesetzte Oligonukleotide für die Versuchsdurchführung.

Anwendung	Name	Sequenz 5' → 3'	Amplifikatlänge [bp]	Referenz
<i>Rpv10#2^r</i>	fwdPr_G4_II	ATCTTTCACCTCTGGCCTC TTTGAGGCGT		
	revPr_G4_I	GGTGAATAGTAA TAGAAGTG GGGGA	912	
<i>Rpv10#2^s</i>	fwdPr_AP2_I_Sus	CCTCAAATCTCTCTCTCTGT TTCTC		
	revPr_AP2_I_Sus	GAATAGTAATAGAAAGTCGGG GGA	996	
<i>Rpv10#1^r</i>	fwdPr_G6_I	TACCACAAAAACAATGACCCA CCAACGC		
	revPr_G6_I	CACTCACCAACCAAGTTCTT CAAA	3196	
<i>Rpv10#1^s</i>	fwdPr_RPS5_II_Sus	GCATGACTGGTCGAACTTTT TCGGG		
	revPr_RPS5_II_Sus	GCAAACCTCCATGACATACA ACTCTAG	3033	
Promotor <i>Rpv10#2^r</i>	Pro_AP2Res_fwdI	TAATTCAAAGTTATGACTCAA CCCTA		
	Pro_AP2Res_revII	TACAAAAGGCTACAAAACGTG G	915	
Promotor <i>Rpv10#2^s</i>	Pro_AP2Sus_fwdI	TCTAAACGATTACTTGA AAT TTGTATAT		
	Pro_AP2Sus_revII	GTATTTGAGGTGGGAGAAGG GTCATTTGATCTGTTAGCAA	1515	
Promotor <i>Rpv10#1^r</i>	Pro_RPS5Res_fwdIII	GTATATGCG		
Promotor <i>Rpv10#1^r</i>	Pro_RPS5Res_revII	GCCTGAAAAGATTTCGGACCA GTC	1402	

Tabelle A.2: Teil 2: Eingesetzte Oligonukleotide für die Versuchsdurchführung.

Anwendung	Name	Sequenz 5' → 3'	Amplifikatlänge [bp]	Referenz
	fwdPr_Ap2_Res_InFuC	<u>GTGACCTGCATGAATTGTCA</u> AGCCGACGGATTTCCTTAT		
	revPr_Ap2_Res_InFuC	T GCCTGTCGACATCGATAAGC <u>TGGTGAATAGTAATAGAAGT</u> GGGGGA	2801	
In Fusion Cloning gRpv10#2 ^r	fwdPr_Ap2_Sus_InFuC	GTGACCTGCATGAATTCTA AACGATTACTTTGAAATTTGT ATAT		
	revPr_Ap2_Sus_InFuC	GCCTGTCGACATCGATAAGC TGAATAGTAATAGAAGTCGG GGGA	2509	
In Fusion Cloning gRpv10#2 ^s	fwdPr_RPS5_Res_InFuC	<u>GTGACCTGCATGAATTGTCA</u> TTTGATCTGTTAGCAAGTAT ATGCG		
	revPr_RPS5_Res_InFuC	<u>GCCTGTCGACATCGATAAGC</u> <u>TCACTCACCACCAACGTTCT</u> TCAAA	4894	
In Fusion Cloning gRpv10#1 ^r	fwdPr_RPS5_Sus_InFuC_new	<u>GTGACCTGCATGAATTCTGA</u> TGATAAAAAAGGGAGACGGT GA		
	revPr_RPS5_Sus_InFuC	GCCTGTCGACATCGATAAGC TCTAGAGTTGTATGTCATGG AGGTTTGC	5145	
In Fusion Cloning gRpv10#1 ^s	ITS6-CK_Pero	GAAGGTGAAGTCGTAACAAG G		
	ITS7-CK_Pero	AGGTTTCTTCATCGATGTGC CAACATCCTTTACCCATTGA CAGA	314	(Cooke et al., 2000)
ITS <i>P. viticola</i>	fwd_SAND			
qRT-PCR SAND (VIT_206s004g02820)	rev_SAND	CCTTATCTGCAAGTGGATCAA ATGC	76	

Tabelle A.3: Teil 3: Eingesetzte Oligonukleotide für die Versuchsdurchführung.

Anwendung	Name	Sequenz 5' → 3'	Amplifikationslänge [bp]	Referenz
qRT-PCR <i>UBC</i> (VIT_215s0046g01400)	fwd_UBC	CATAAGGGCTATCAGGAGGA		
	rev_UBC	TGGCGGTCGGAGTTAGG	161	
qRT-PCR <i>ERF5</i> (VIT_216s0013g01120)	fwd_ERF	TTCTGCCGACTCTACTACTG		
	rev_ERF	GGGGAGTTATGTGATGGAG	82	
qRT-PCR <i>WRKY75</i> (VIT_214s0068g01770)	fwd_WRKY75	GGAGGAAGTACGGTCAAAAG		
	rev_WRKY75	GGATAGGCGTTGCACCTGCT	107	
3'RACE für cDNA-Synthese	3'RACE	CAGGACGGGTGCGCGTTCC		
		ATGTATTTTTTTTTTTTT		
3'RACE für PCR	3'RACE-Linker	CAGGACGGGTGCGCGTTCC		
		ATGTA		
3'RACE für PCR	RPS5_3Race_fwd_II	GGACAAATGACACCACCAAAAT		
		CATG		
3'RACE für Nested-PCR	RPS5_3Race_fwd_III	CAC TTGTAAGATGCATGATG		
		TGATCC		
5'RACE	RPS5_5Race_rev_I	GGATCACATCATGCATCTTA		
		CAAAGTGT		
5'RACE	18SrRNaf	GATTTCGGTCCTATTCTGTT		
		GG		
Sicherung Trafo <i>Rpv10#2</i>	fwd_G4	GTC AAGCCGACGGATTTC		
	RB_rev	TTATT	1450	
		GTTTACCCGCCAATATTCC		
Sicherung Trafo <i>Rpv10#2</i>	fwd_G4	GTC AAGCCGACGGATTTC		
	rev_G4	TTATT	866	
		CTTGCTTCTCTCCATTGC		

A.2 Abbildungen

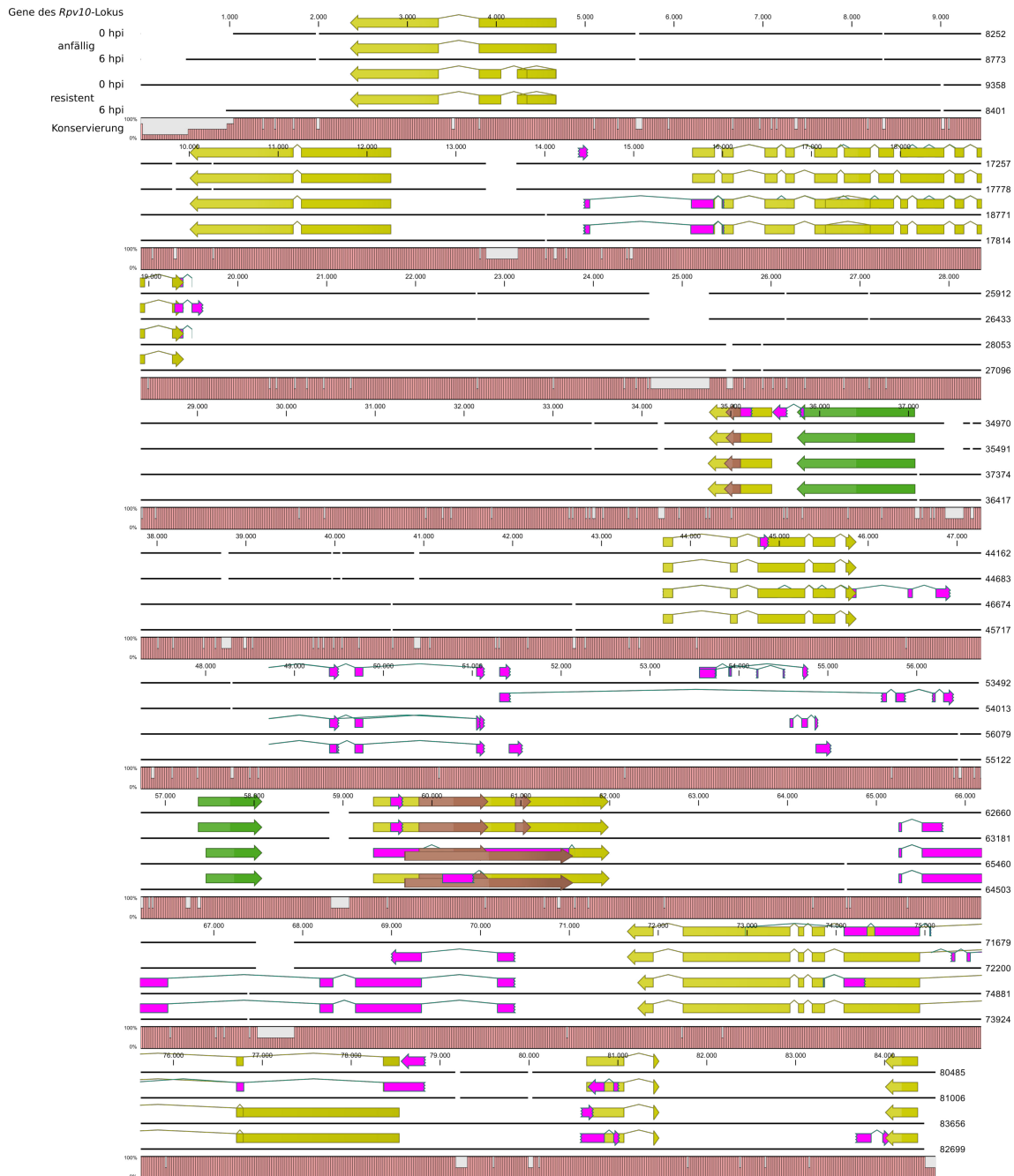


Abbildung A.1: Darstellung der Gene des anfälligen und resistenten *Rpv10*-Lokus. In der Abbildung sind der anfällige und resistente Haplotyp des *Rpv10*-Lokus gegeneinander verglichen. Es wurden alle auf dem *Rpv10*-Lokus befindlichen Gene (CDS - gelb, Promotorregion der Kandidatengene - grün, Domänen - braun) der *in silico* Vorhersage auf beiden Haplotypen annotiert. Zusätzlich wurde aus der RNA-Seq-Analyse die wahrscheinliche kodierende Sequenz annotiert (pink). Es ist dabei der Vergleich zwischen 0 hpi und 6 hpi innerhalb eines Haplotypen sowie zwischen beiden dargestellt.

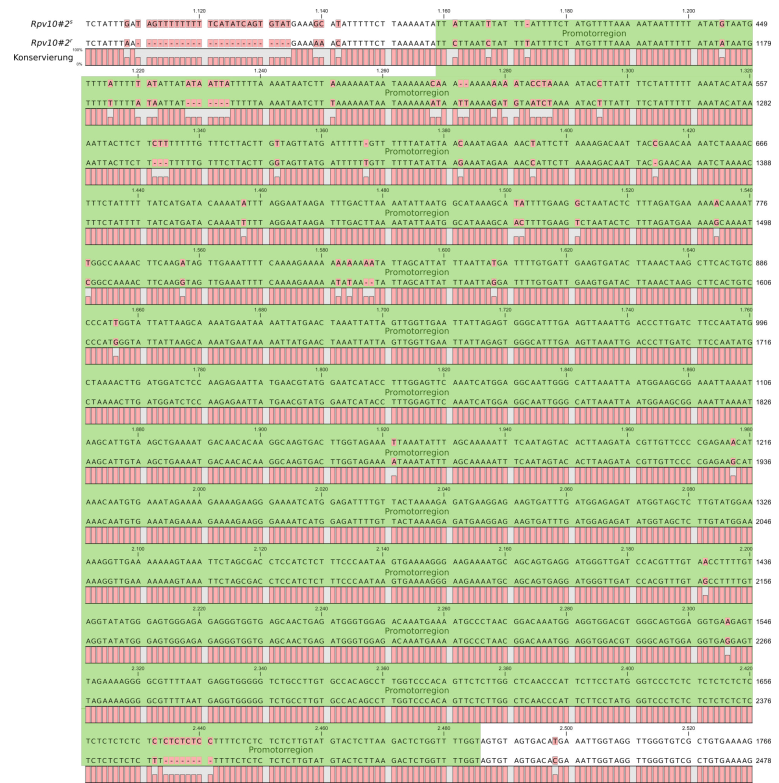


Abbildung A.2: Promotorregion Kandidatengen *Rpv10#2^s* des *Rpv10*-Lokus.

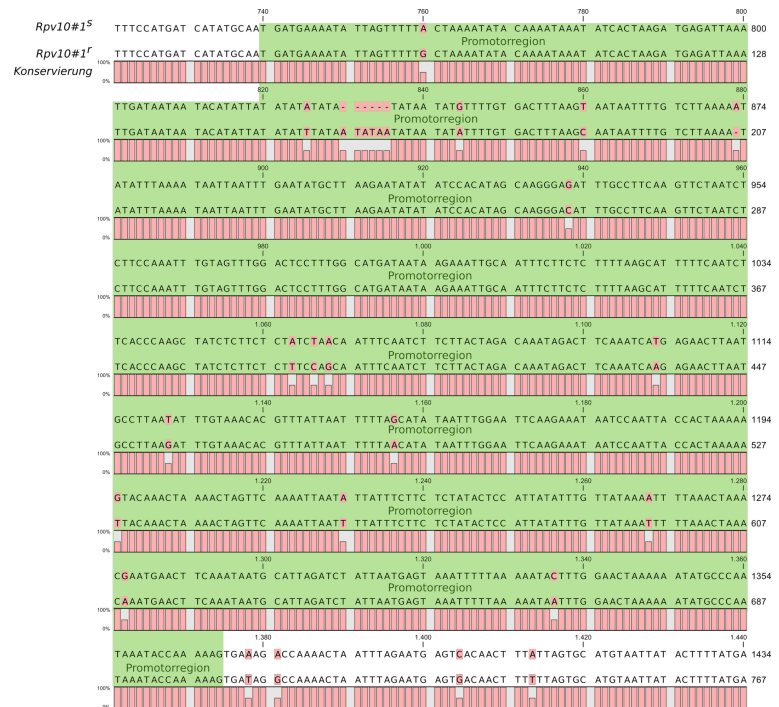


Abbildung A.3: Promotorregion Kandidatengen *Rpv10#1^s* des *Rpv10*-Lokus.

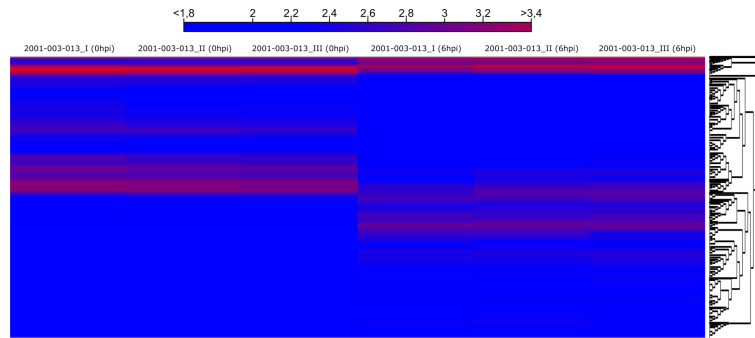


Abbildung A.4: Darstellung der Expressionsänderung der DEGs als Heatmap vom Genotyp 2011-003-013 (*Rpv10/Rpv10*). Die Heatmap zeigt alle drei biologischen Replikate von 0 hpi und 6 hpi und deren Expressionsänderung. $FC > 2$; $p\text{-value} < 0.05$. Expressionswerte sind \log_{10} -transformiert und reichen von 1.8 (blue) to 3.4 (red).

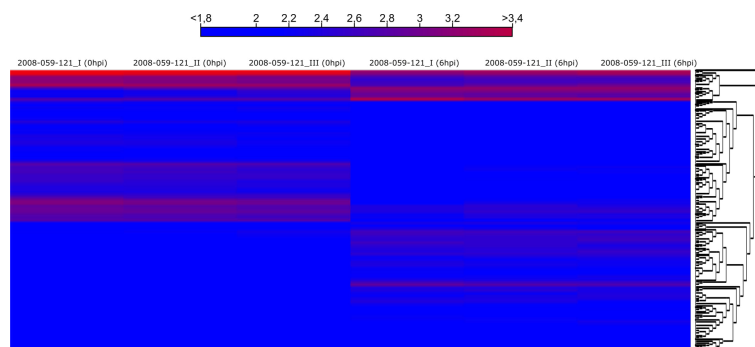


Abbildung A.5: Darstellung der Expressionsänderung der DEGs als Heatmap vom Genotyp 2008-059-121 (*Rpv10/Rpv3*). Die Heatmap zeigt alle drei biologischen Replikate von 0 hpi und 6 hpi und deren Expressionsänderung. $FC > 2$; $p\text{-value} < 0.05$. Expressionswerte sind \log_{10} -transformiert und reichen von 1.8 (blue) to 3.4 (red).

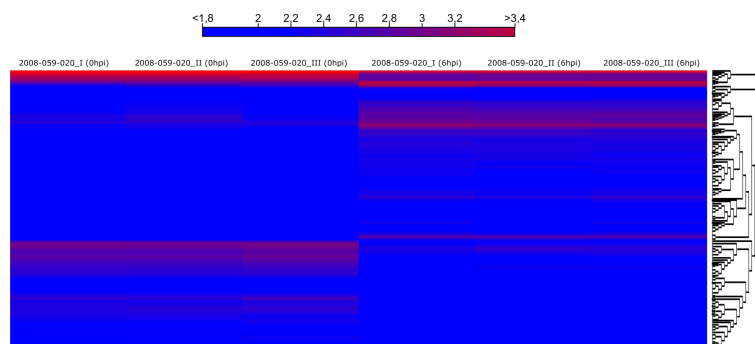


Abbildung A.6: Darstellung der Expressionsänderung der DEGs als Heatmap vom Genotyp 2008-059-020 (*Rpv-/Rpv-*). Die Heatmap zeigt alle drei biologischen Replikate von 0 hpi und 6 hpi und deren Expressionsänderung. $FC > 2$; $p\text{-value} < 0.05$. Expressionswerte sind \log_{10} -transformiert und reichen von 1.8 (blue) to 3.4 (red).

B Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere wahrheitsgemäß, die Arbeit selbstständig verfasst, alle benutzten Hilfsmittel vollständig und genau angegeben und alles kenntlich gemacht zu haben, was aus Arbeiten anderer unverändert oder mit Abänderungen entnommen wurde sowie die Satzung des KIT zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet zu haben. Teile der Arbeit wurden in Fachjournalen veröffentlicht.

Karlsruhe, 02.09.2019

Sarah Fröbel

C Über die Autorin

C.1 Lebenslauf

Allgemeine Angaben

27.12.1987 geboren in Zwickau
Familienstand verheiratet

Schulbildung

10/2016 – 10/2019 Doktorandin und wissenschaftliche Mitarbeiterin “Julius Kühn-Institut (JKI) Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen Geilweilerhof“, Siebeldingen
09/2014 – 03/2015 Wissenschaftliche Mitarbeiterin - “Bioinformatics group Mittweida (BigM)“, Mittweida
09/2012 – 08/2014 Master of Science - Bioinformatik/Molekularbiologie “Hochschule Mittweida“, Mittweida
09/2009 – 08/2012 Bachelor of Science - Bioinformatik/Biotechnologie “Hochschule Mittweida“, Mittweida
09/2008 – 08/2009 Fachhochschulreife “Fachoberschule für Sozialwesen“, Zwickau
08/2004 – 08/2008 Medizinisch-technische Laboratoriumsassistentin “Die Schule“, Zwickau

C.2 Publikationen

Fröbel S., Dudenhöffer, J., Töpfer, R., & Zyprian, E.: Transcriptome analysis of early downy mildew *Plasmopara viticola* defense in grapevines carrying the Asian resistance locus *Rpv10*. In: EUPHYTICA, K. (Hrsg.): doi.org/10.1007/s10681-019-2355-z. Springer Nature Switzerland : Euphytica, 2019, 215. Jg., Nr. 2, S. 28

Fröbel S. & Zyprian, E.: Colonization of different grapevine tissues by *Plasmopara viticola* - a histological study
In: FRONTIERS IN PLANT SCIENCE, K. (Hrsg.): doi.org/10.3389/fpls.2019.00951. Frontiers in Plant Science, 2019, Nr. 10, S. 951

